



# Valorisation d'acides gras volatils issus de fermentation anaérobie par la production de lipides microbiens, précurseurs de biodiesel

Vanessa Beligon

## ► To cite this version:

Vanessa Beligon. Valorisation d'acides gras volatils issus de fermentation anaérobie par la production de lipides microbiens, précurseurs de biodiesel. Alimentation et Nutrition. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2016. Français. NNT : 2016CLF22687 . tel-01342501

**HAL Id: tel-01342501**

**<https://theses.hal.science/tel-01342501>**

Submitted on 6 Jul 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE,  
ENVIRONNEMENT**

N° d'ordre : 688

Thèse présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de

**Docteur d'Université**

(Spécialité : Nutrition et Sciences des Aliments)

Soutenue publiquement le 5 avril 2016

**Vanessa BELIGON**

---

**Valorisation d'acides gras volatils issus de fermentation  
anaérobie par la production de lipides microbiens,  
précurseurs de biodiesel**

---

**Rapporteurs :** Pascal DHULSTER, Professeur des Universités, Université Lille 1

Etienne PAUL, Professeur des Universités, INSA/LISBP Toulouse

**Examineurs :** Carine BIDEAUX, Ingénieur de Recherche, INSA/LISBP Toulouse

Christian LARROCHE, Professeur des Universités, Polytech/Université Blaise Pascal

Eric TRABLY, Ingénieur de Recherche, INRA Narbonne

**Directeurs** Pierre FONTANILLE, Maître de Conférences HDR, Polytech/Université Blaise Pascal

**de thèse :** André LEBERT, Professeur des Universités, Polytech/université Blaise Pascal



## Résumé

Une part importante de la production mondiale de vecteurs énergétiques et de produits chimiques provient de la raffinerie de combustibles fossiles. En raison de l'augmentation du prix du pétrole et de son impact environnemental, la recherche de solutions alternatives, écologiques et économiques constitue l'un des enjeux de notre siècle. Le remplacement du pétrole par de la biomasse en tant que matière première pour la production de carburants et de produits chimiques constitue la force motrice dans le développement de complexes de bioraffinerie.

Cette étude fait partie d'un projet de bioraffinerie visant la valorisation de biomasse lignocellulosique par la production d'hydrogène et de lipides microbiens précurseurs de biodiesel. Ce travail se concentre en particulier sur l'étape de production de biomasse et de lipides par la levure oléagineuse *Cryptococcus curvatus* à partir d'acides gras volatils (AGVs) synthétisés au cours de la fermentation anaérobie productrice d'hydrogène. Les cultures ont dans un premier temps été réalisées à partir d'un substrat modèle, l'acétate, en fed-batch et en continu. La détermination de l'influence de différents paramètres opératoires sur la production de biomasse et de lipides à partir d'acétate a permis de mettre au point des cultures en fed-batch dont les cinétiques, les productivités et les rendements finaux étaient compétitifs avec ceux rapportés dans la littérature pour des cultures sur substrats simples. Un modèle de croissance et de production de lipides a été construit à partir de ces données afin de prédire le comportement de la souche lors de cultures continues, permettant d'obtenir des productivités en lipides et en biomasse élevées. Enfin, des cultures ont été menées à partir d'AGVs issus de surnageant de fermentation anaérobie. Les résultats ont confirmé la croissance de ces levures sur ce substrat particulier et la production de lipides dont la composition en acides gras estérifiés était compatible avec une utilisation comme biodiesel.

**Mots clés :** *bioconversion – acides gras volatils – Cryptococcus curvatus – lipides microbiens – biodiesel*

## Abstract

A great part of the global production of energy vectors and chemicals comes from fossil fuels refinery. Because of the increase in oil price and their environmental impacts, the search for alternative, ecological and economic solutions is a current challenge. The replacement of oil with biomass as raw material for the production of fuels and chemicals is the driving force for the development of biorefinery complexes.

This study is part of a project aiming at the biorefinery of lignocellulosic biomass for hydrogen and microbial lipids as biodiesel precursors. This work focuses on the biomass and lipids production step by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* using volatile fatty acids (VFAs) as carbon sources, which are synthesized during the anaerobic fermentation step. Yeast cultures have initially been realized using a model substrate, acetate, and fed-batch and continuous modes. The determination of the influence of different operating parameters on the biomass and lipids production led to the development of fed-batch cultures which kinetics, productivities and yields were competitive with those reported in the literature for cultures on simple substrates. A growth and lipid production model was built from these data to predict the behavior of the strain during continuous cultures and to obtain high lipid and biomass productivities. Finally, cultures were conducted using VFAs from anaerobic fermentation supernatant. The results confirmed the growth of these yeasts on this particular substrate and the production of lipids which composition was compatible with use as biodiesel.

**Keywords:** *bioconversion – volatile fatty acids – Cryptococcus curvatus – microbial lipids - biodiesel*





## REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été menés au sein de l'axe Génie des Procédés, Energétique et Biosystèmes de l'Institut Pascal. Je remercie **Michel Dhome**, directeur de l'Institut Pascal et **Claude-Gilles Dussap**, directeur de l'axe GePEB, de m'avoir accueilli et permis d'effectuer cette étude dans les meilleures conditions.

Je remercie **Carine Bideaux**, **Etienne Paul**, **Pascal Dhulster**, **Eric Trably** et **Christian Larroche** de m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse. Un grand merci à Carine et Eric d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse, leurs conseils à mi-parcours ont donné un nouveau souffle à ce travail. Merci également à Christian d'avoir présidé ce jury et pour le partage de ses larges connaissances scientifiques tout au long de ces années de thèse.

Je remercie mon directeur de thèse, **Pierre Fontanille**, de m'avoir fait confiance il y a de cela 4 ans en me proposant de poursuivre le travail de stage de master en thèse. Tu as dirigé ces travaux d'une main de maître et je te remercie de m'avoir toujours poussé à valoriser mon travail. Je te souhaite une belle réussite dans ta nouvelle aventure professionnelle !

Je remercie également mon co-directeur de thèse, **André Lebert**, pour sa gentillesse et de m'avoir accueilli dans ce Master 2 et, par la suite, d'avoir accepté d'encadrer ce travail de thèse.

J'adresse mes vifs remerciements à mon encadrante de thèse « officieuse » **Gwendoline Christophe** qui a participé activement au bon déroulement de cette thèse. Merci pour tous tes conseils scientifiques, tes relectures, nos petites discussions dans ton bureau et d'avoir toujours répondu présente dans les moments de « moins bien ».

Je remercie **Laurent Poughon** pour tout le travail réalisé sur l'aspect « modélisation » de cette thèse ainsi que toutes ses (patientes et nombreuses) explications. Merci également à **Agnès Pons** pour l'intronisation dans le monde du continu, des taux de dilution et des bidons de 20 litres.

**David** (David Duchez ohé ohé), merci d'avoir répondu à tous mes appels au secours au cours de cette thèse ! L'HPLC, le réacteur, le COT-NOT (bon en fait tout le matériel) n'auraient pas fini de m'en faire voir de toutes les couleurs sans ton aide !

Merci à **Christine Gardarin** (Chrichri) pour son aide, ses conseils en microbiologie et les nombreux dépannages matériels. Merci également pour tous ces repas de midi partagés ensemble, les moments « potins » et tes expressions toutes plus imagées les unes que les autres. Ma préférée reste sans aucun doute « il va bientôt bouffer les pissenlits par la racine ».

Je remercie les membres de NeoBioSys : **Grégory** (Pompon, Grrri-grrri, Rodrigue ? on ne sait plus) et **Nicolas**. Merci pour tous les coups de main mais aussi les chants tonitruants (le fameux lac du Connemara, le lion de Cléopâtre et j'en passe). Spéciale dédicace à Pompon qui m'aura fait redécouvrir des classiques (*Cuitas les bananas, découpées en dos les patatos*) grâce à la Compil' du Bioréacteur (bientôt dans les bacs). Je vous souhaite un avenir professionnel radieux, à la hauteur des efforts que vous déployez chaque jour pour votre boîte !

Je remercie chaleureusement toutes celles et ceux qui ont partagé le fameux bureau des *C'est pas moi* : **Numidia**, **Aurore**, **Fatou**, **Aicha**, **Véro**, **Hanadi**, **Alex**, **Benoit**... Que de souvenirs ! Je me

souviendrai longtemps des débats passionnés du vendredi après-midi, des instants de stress pré-réunion, de la mobilisation générale de tous les cerveaux pour les calculs à 38 inconnues de Fatou, de l'histoire du carton que s'est pris Numidia (littéralement) et du voisin préféré d'Aïcha (ahahahah).

Un merci tout particulier à mon partenaire de galère fermentaire, **Alexandre de Noblewesh**, pour toute l'aide apportée au cours de cette thèse ainsi que les nombreux fou-rires (ce mythique « **HEY ! Hey ! .....** hey » restera dans les mémoires). Je suis certaine que mes « faut que je te raconte un truc » te manquent déjà ☺ Bon courage pour la fin de tes travaux !

Cette thèse n'aurait pas été la même si je n'avais pas rencontré les membres du très select club du Tea Gathering : **Nelly, Véronique** (qui m'a trouvé le parfait sous-titre de cette thèse : *50 nuances de Graisse*), **Azin, Eglantine, Lucie et Sarah**. Au-delà de simples collègues, vous êtes toutes devenues de véritables amies au fil des ans. Pêle-mêle, merci pour : les tea gatherings, les brunchs, les fou-rires, les potins au détour d'une paillasse, les séances de soutien, les mimes étranges, le fameux groupe WhatsApp des filles du LGCB et ses photos de chats et de Chloé chou, « serpillère !!! », le voyage à Londres... Ca commence à en faire des souvenirs. Je vous adore toutes.

Je remercie également les autres doctorants avec qui j'ai traversé ces années de thèse : **Ghiles, Vincent, Tania, Zaineb** et les autres ; ainsi que les stagiaires qui sont passés au laboratoire. Je retiens les gargantuesques repas du mercredi qui, eux, n'auront pas aidé à ma productivité.

Un merci également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à rendre ces trois ans agréables : **Alina** et ses proverbes roumains, **Fred** pour m'avoir laissé piller le hall des procédés, **Guillaume, Cédric, les Fabrice** et leur bonne humeur, **Mr Michaud** et ses phrases assassines (*tu soutiens en avril... mais en avril 2017 ?*). Merci à **Monique et Patrick** pour leur gentillesse et la demande régulière de nouvelles au cours de la rédaction de cette thèse. Ma **Melem**, de Nouméa à Lyon à Paris en passant par la Guyane, des millions de mercis pour ton amitié et ton soutien depuis si longtemps.

Le plus grand des mercis ira à ma famille, tout particulièrement **mes parents et ma sœur**. Merci à mes parents de m'avoir toujours laissé la liberté de choisir ce que je voulais faire de ma vie et de m'y avoir aidé, tant que cela me rendait heureuse. Je reconnais ma chance et je souhaite à tous d'être aussi bien entouré et soutenu dans ses projets, comme mes parents l'ont toujours fait. Cette thèse, qui signe l'accomplissement de ces années de travail, vous est dédiée. Merci à ma sœur de m'avoir patiemment écouté râler au sujet de la thèse. Je vais devoir trouver un nouveau motif pour me plaindre maintenant.

Enfin, last but not least, merci à **Nicolas**, ma moitié. Est-il nécessaire de dire que cette thèse n'aurait pas été la même sans toi ? Sans ton soutien permanent, tes conseils spécial « super héros du labo » et ta façon de te réjouir pour moi, ces trois ans auraient été très différents et certainement pas aussi agréables. Merci pour tout, pour ce début de vie à deux (deux et demi avec le mini tigre de la maison), et toutes les choses que tu as faites pour moi ces dernières années. C'est un nouveau chapitre qui s'ouvre à nous maintenant et j'ai hâte de savoir ce que l'avenir nous réserve !

*No discovery is useless,  
no curiosity misplaced or too ambitious,  
and we may be certain that every advance  
achieved in the quest of pure knowledge will  
sooner or later play its part in the service of man.*

**Ernest Henry Starling**

## LISTE DES ABREVIATIONS

%EM	Proportion d'ester méthylé d'acide gras	I <sub>2</sub>	Centre de la courbe sigmoïde déclenchant l'arrêt de la production de lipides
%lip	Teneur en lipides	IC	Indice de cétane
μ	Taux de croissance	IDH	Isocitrate Déhydrogénase
μ <sub>max</sub>	Taux de croissance maximal	II	Indice d'iode
ACL	ATP-citrate lyase	IR	Infra-Red
ACP	Acyl Carrier Protein	KAR	Acetoacyl-ACP reductase
AGVs	Acides gras volatils	KAS	β-ketoacyl-ACP synthase
AIE	Agence Internationale de l'Energie	K <sub>La</sub>	Coefficient de transfert d'oxygène volumétrique
ALA	Acide α-linolénique	K <sub>s</sub>	Concentration de S menant à μ <sub>max</sub> /2
ARA	Acide arachidonique	LA	linoleic acid
ASPO	Association for the Study of Peak Oil	m	Terme de maintenance
B	Vitesse de production de lipides	MM	Masse molaire
BODIPY	Boron-dipyrromethene	MS	Mass spectrometry
BTL	Biomass To Liquid	MS	Masse sèche
C/N	Carbone/Azote	NMR	Nuclear Magnetic Resonance
C <sub>L</sub>	Concentration en lipides	NOx	Oxydes d'azote
CLA	conjugated linolenic acid	Opep	Organisation des pays exportateurs de pétrole
CMC	Carboxymethyl <i>cellulose</i>	P	Pression absolue
D	Taux de dilution	PABA	acide para-aminobenzoïque (vitamine B10)
DCW	Total dry cell weight (g/L)	PCM	Pile à combustible microbienne
DGLA	Acide Dihomo-γ-linolénique	PDA	Potato Dextrose Agar
DHA	Acide docosahexaénoïque	PFK	Phosphofructokinase
DL	Nombre de doubles liaisons	PKS	Polyketide synthase
DME	Diméthyleter	P <sub>L</sub>	Productivité en lipides
DO	Densité optique	PMS	Phenazin methosulfate
EAR	Enoyl-ACP reductase	pO <sub>2</sub>	Pression partielle en oxygène dissous
EM	Ester méthylé d'acide gras	<i>psi</i>	« pound-force per square inch » (unité de pression anglo-saxonne)
EPA	Acide eicosapentaénoïque	PUFA	polyunsaturated fatty acid
FAME	Fatty Acid Methyl Ester	P <sub>x</sub>	Productivité en biomasse
FAO	Food and Agriculture Organisation	q <sub>L</sub>	Productivité en lipides spécifique
FAS	Fatty Acid Synthase	q <sub>s</sub>	Vitesse spécifique de consommation de substrat
FDA	Food and Drug Administration	rC/rN	Carbone résiduel/Azote résiduel
F <sub>feed</sub>	Débit du milieu d'alimentation	R <sub>L</sub>	Vitesse de production de lipides
F <sub>pH</sub>	Débit de la solution d'alimentation utilisée en régulation pH	R <sub>m</sub>	Loi cinétique de maintenance
G	Temps de génération	rpm	Rotations par minute
GC	Gas Chromatography	R <sub>si</sub>	Vitesse de production de composés
G <sup>E</sup>	Débit molaire gazeux	R <sub>x</sub>	Vitesse de production de biomasse
GLA	Acide γ-linolénique	SCO	Single Cell Oil
GRAS	Generally Recognized as Safe		
He(T)	Constante de Henry à 30°C		
HPLC	High Performance Liquid Chromatography		
I <sub>1</sub>	Centre de la courbe sigmoïde déclenchant la production de lipides		

Shift <sub>RL</sub>	Shift métabolique vers la production de lipides	TF	Triphenylformasan
Si	Concentration en gaz dissous ou en composés	TFA	Total Fatty Acid
Si*	Concentration en gaz dissous dans les conditions de saturation	TTC	Triphenyltetrazolium chloride
Si <sub>feed</sub>	Concentration en nutriments dans le milieu d'alimentation (continu)	USGS	United States Geological Survey
Si <sub>pH</sub>	Concentration en nutriments dans le milieu d'alimentation (fed-batch)	v/v	volume/volume
S <sub>lip</sub>	Concentration en lipides	VFAs	Volatile fatty acids
S <sub>N</sub>	Concentration en azote	V <sub>L</sub>	Volume du réacteur
SO	Stabilité oxydative	WHO	World Health Organization
S <sub>O2</sub>	Concentration en oxygène	Wt. %	Pourcentage massique
SSF	Solid state fermentation	X	Concentration en biomasse privée de lipides
TCA	Tricarboxylic acid	yCO <sub>2</sub>	Fraction molaire en CO <sub>2</sub> dans l'air
		Y <sub>CO2/S</sub>	Rendement en CO <sub>2</sub>
		Y <sub>L/S</sub>	Rendement en lipides
		Y <sub>X/S</sub>	Rendement en biomasse
		ΔH <sub>c</sub>	Chaleur de combustion
		ν	Viscosité cinématique



## TABLE DES MATIERES

<b>Remerciements .....</b>	<b>5</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>8</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>11</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>20</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>23</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>27</b>
<b>CHAPITRE I : Etude bibliographique.....</b>	<b>31</b>
<b>1. CONTEXTE DE L'ETUDE .....</b>	<b>32</b>
1.1. Consommation des énergies fossiles .....	32
1.2. Les biocarburants .....	33
<b>2. LE BIODIESEL .....</b>	<b>36</b>
2.1. Caractéristiques du biodiesel .....	36
2.2. Mode de production du biodiesel .....	39
2.2.1. Voies thermo-chimiques .....	39
2.2.1.1. Gazéification de la biomasse .....	39
2.2.1.2. Pyrolyse de la biomasse et formation de bio-oil .....	40
2.2.2. Voies biologiques.....	40
2.2.2.1. Plantes oléagineuses .....	40
2.2.2.2. Microalgues .....	42
2.2.2.3. Levures oléagineuses.....	43
2.2.2.4. Analyse et comparaison économique des voies biologiques de productions de biodiesel .....	44
2.2.2.4.1. Nature de la source de carbone et d'énergie.....	44
2.2.2.4.2. Cinétique de croissance et productivité .....	44
2.2.2.4.3. Coûts de production .....	45
2.2.2.4.4. Conclusions.....	49
<b>3. MICROBIAL SINGLE-CELL OILS: PRECURSORS OF BIOFUELS AND DIETARY SUPPLEMENTS .....</b>	<b>50</b>
3.1. Introduction.....	51
3.2. Single-cell oils as precursors of biodiesel .....	52
3.2.1. Bio-oils as biodiesel .....	52
3.2.2. Potential microorganisms for the production of lipids .....	54
3.2.3. Lipogenesis .....	59



3.2.4. Lipid accumulation conditions.....	61
3.2.5. Key enzymes of lipid accumulation .....	62
3.2.5.1. Isocitrate dehydrogenase.....	62
3.2.5.2. ATP:citrate lyase .....	63
3.2.5.3. Malic enzyme.....	64
3.2.6. Cultivation modes for lipid accumulation .....	64
3.2.6.1. Batch operation .....	64
3.2.6.2. Continuous operation.....	65
3.2.6.3. Fed-batch operation .....	66
3.2.7. Extraction, quantification and identification of lipids .....	66
3.2.7.1. Extraction methods .....	66
3.2.7.2. Lipid quantification.....	68
3.2.7.2.1. Gravimetric assay .....	68
3.2.7.2.2. Triphenyltetrazolium chloride assay (TTC) .....	68
3.2.7.2.3. Nile Red photofluorescent assay.....	68
3.2.7.2.4. Vanillin assay .....	69
3.2.7.3. Fatty acids identification methods.....	69
3.2.8. Single-cell oil as future biodiesel? .....	70
3.3. Microbial production of omega-3 and omega-6 .....	71
3.3.1. An original way to produce PUFAs .....	71
3.3.2. Omega-3 fatty acids.....	72
3.3.3. Omega-6 fatty acids.....	72
3.3.4. An original and future way to produce PUFAs .....	73
3.3.5. Biosynthesis of PUFAs .....	74
3.3.5.1. Elongation/desaturation pathway .....	74
3.3.5.2. Anaerobic polyketide synthase pathway .....	76
3.3.6. Omega-3 and omega-6 produced by micro-organisms.....	77
3.3.6.1. Microbial production of GLA .....	77
3.3.6.2. Microbial production of DHA .....	78
3.3.6.3. Microbial production of EPA .....	79
3.3.6.4. Microbial production of ARA.....	79
3.3.7. Processes for microbial PUFAs production .....	84
3.3.7.1. Submerged fermentation.....	84

3.3.7.2. Solid-state fermentation .....	84
3.3.8. Downstream processing of PUFAs .....	85
3.3.8.1. Recovery of oils in fungi .....	85
3.3.8.2. Refining and modification of microbial oils.....	85
3.3.9. Future outlook.....	87
4. UTILISATION DES ACIDES GRAS VOLATILS (AGVs) POUR LA PRODUCTION DE BIODIESEL .....	<b>88</b>
4.1. <i>Cryptococcus curvatus</i> .....	89
4.2. Voies de production de lipides microbiens à partir d'AGVs.....	90
4.2.1. Mécanismes d'entrée des AGVs dans la cellule .....	90
4.2.1.1. Caractéristiques des principaux AGVs.....	90
4.2.1.2. Le transport passif des AGVs par diffusions simple et facilitée .....	91
4.2.1.3. Transport actif des AGVs .....	93
4.2.2. Assimilation des AGVs dans le métabolisme.....	95
5. OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE .....	<b>97</b>
<b>CHAPITRE II : Matériels et méthodes.....</b>	<b>99</b>
1. Conditions de culture .....	<b>100</b>
1.1. Description de la souche utilisée.....	100
1.2. Description des milieux utilisés .....	100
1.2.1. Milieux de préculture et de culture.....	100
1.2.2. Culture de <i>Cryptococcus curvatus</i> sur substrat modèle .....	101
1.2.2.1. Sources de carbone .....	101
1.2.2.2. Milieux d'alimentation utilisés pour les cultures en fed-batch.....	101
1.2.2.3. Solution de vitamines .....	104
1.2.2.4. Milieux d'alimentation utilisés au cours des cultures en continu.....	104
1.2.3. Cultures de <i>Cryptococcus curvatus</i> sur surnageant de culture.....	105
1.2.3.1. Sources de carbone .....	105
1.2.3.2. Composition des milieux utilisés lors des précultures en Erlenmeyer.....	106
1.2.3.3. Composition des milieux utilisés lors des cultures en bioréacteur .....	107
1.3. Mise en culture.....	109
1.3.1. Précultures sur substrat modèle .....	109
1.3.2. Précultures sur substrat réel .....	109
1.3.3. Cultures en bioréacteur.....	109
1.3.3.1. Culture en batch .....	109
1.3.3.1.1. Description du réacteur et système de commande et régulation .....	109

1.3.3.1.2. Préparation du réacteur .....	110
1.3.3.2. Culture en fed-batch .....	111
1.3.3.2.1. Description du réacteur et système de commande et régulation .....	111
1.3.3.2.2. Préparation du réacteur et conduite de culture sur substrat modèle .....	112
1.3.3.2.2. Préparation du réacteur et conduite de culture sur substrat réel.....	115
1.3.3.3. Cultures en continu .....	115
1.3.3.3.1. Description du réacteur.....	115
1.3.3.3.2. Préparation du réacteur et déroulement des cultures .....	116
<b>2. Traitement des échantillons.....</b>	<b>117</b>
2.1. Analyse de la biomasse .....	118
2.2. Dosage des métabolites par HPLC.....	118
2.3. Dosage des ions ammonium .....	118
2.4. Dosage des oses neutres .....	119
2.5. Extraction et analyse des lipides .....	119
2.5.1. Prétraitement de la biomasse .....	119
2.5.2. Méthode d'extraction des lipides.....	119
2.5.3. Analyse de la fraction lipidique .....	119
<b>3. Traitement des données expérimentales .....</b>	<b>120</b>
3.1. Calculs de rendements .....	120
3.2. Détermination des paramètres du biodiesel .....	122
<b>4. Récapitulatif .....</b>	<b>123</b>
<b>CHAPITRE III : Etude des paramètres opératoires influant sur la production de lipides par</b>	
<b>Cryptococcus curvatus à partir d'un substrat modèle, l'acétate, en culture fed-batch.....</b>	<b>125</b>
1. Avant-propos du chapitre III.....	127
2. Stratégies mises en place pour l'amélioration de la production de lipides a partir d'acetate par cryptococcus curvatus selon un mode fed-batch.....	128
2.3. Analyse de la composition en acides gras et prédiction de la qualité du biodiesel .....	132
2.4. Discussion autour de la stratégie envisagée .....	135
3. Influence des paramètres opératoires sur la production de biomasse et de lipides par la levure oléagineuse C. curvatus à partir d'acétate .....	135
3.1. Adaptation de la souche.....	136
3.2. Influence du pH du milieu de culture sur l'assimilation de l'acétate.....	136
3.3. Contrôle du mode d'alimentation de la source de carbone au sein du réacteur .....	139

3.4. Influence du rapport Carbone/Azote (C/N) sur la production de lipides.....	140
3.5. Bilan de l'influence des paramètres opératoires sur la production de biomasse et de lipides.....	143
4. Improvement and modelling of culture parameters to enhance biomass and lipid production by the oleaginous yeast <i>Cryptococcus curvatus</i> grown on acetate .....	<b>145</b>
4.1. Introduction.....	145
4.2. Materials and methods .....	149
4.2.1. Culture preparation .....	149
4.2.1.1. Strain .....	149
4.2.1.2. Medium culture .....	149
4.2.1.3. Inoculum preparation.....	149
4.2.2. Submerged fermentations .....	150
4.2.2.1. pH-stat batch culture in fermentor .....	150
4.2.2.2. Fed-batch culture for biomass production.....	150
4.2.2.3. Fed-batch culture for lipid production .....	150
4.2.3. Analytical methods.....	151
4.2.3.1. Determination of dry cell weight and turbidity.....	151
4.2.3.2. Determination of acetate concentrations.....	151
4.2.3.3. Measurement of ammonium nitrogen.....	151
4.2.3.4. Measurement of monosaccharide concentration.....	151
4.2.3.5. Cellular lipids extraction and analysis of fatty acid composition .....	152
4.2.4. Numerical methods .....	152
4.2.4.1. Growth model .....	152
4.2.4.2. Bioreactor model.....	153
4.3. Results and discussion.....	154
4.3.1. Improvement of the growth phase on acetate as sole carbon source using a fed-batch culture mode .....	154
4.3.1.1. Influence of neutral pH for the yeast growth on acetate .....	154
4.3.1.2. Improvement of the biomass production strategy .....	157
4.3.1.3. Numerical Model.....	159
4.3.2. Bioconversion of acetate into lipids by <i>C. curvatus</i> in a two-stage fed-batch culture.....	161
4.3.2.1. Determination of the most accurate C/N ratio for lipid accumulation.....	161
4.3.2.2. Analysis of the fatty acids profile .....	163
4.4. Conclusions.....	164
5. Discussion du chapitre III .....	<b>165</b>
5.2. Production de lipides par la levure <i>C. curvatus</i> à partir d'acétate .....	166

5.2.1. Evolution de la production de lipides en fonction du rapport C/N du milieu .....	166
5.2.2. Analyse du comportement métabolique de <i>C. curvatus</i> en fonction des conditions expérimentales.....	167
5.3. Conclusions.....	169
<b>CHAPITRE IV : Développement d'une culture continue de <i>C. curvatus</i> sur acétate : application d'un modèle de croissance et de production de lipides .....</b>	<b>171</b>
1. AVANT-PROPOS DU CHAPITRE IV .....	<b>172</b>
2. INFLUENCE DES PARAMETRES OPERATOIRES SUR LA PRODUCTION DE LIPIDES EN CHEMOSTAT.....	<b>173</b>
2.1. Influence du taux de dilution sur la croissance et la production de lipides.....	174
2.2. Influence d'une limitation nutritionnelle sur la production en lipides .....	175
3. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DE LIPIDES DE LA LEVURE <i>C. CURVATUS</i> CULTIVEE SUR ACETATE .....	<b>176</b>
3.1. Représentation schématique du procédé de culture en fed-batch et en continu.....	176
3.2. Bilan de matière sur les différents composés .....	179
3.3. Développement du modèle de croissance de la levure <i>C. curvatus</i> cultivée sur acétate.....	181
3.3.1. Modèle biologique .....	181
3.3.2. Calibration du modèle de croissance .....	183
3.3.3. Validation du modèle de croissance .....	184
3.4. Développement du modèle de production de lipides et de maintenance .....	186
3.4.1. Modèle biologique .....	186
3.4.2. Calibration du modèle de production de lipides.....	188
3.4.3. Validation du modèle de production de lipides .....	190
3.5. Utilisation prédictive du modèle de culture de <i>C. curvatus</i> pour l'optimisation de paramètres d'une culture en continu .....	190
4. VALIDATION OF A PREDICTIVE MODEL FOR FED-BATCH AND CONTINUOUS LIPIDS PRODUCTION PROCESSES FROM ACETIC ACID USING THE OLEAGINOUS YEAST <i>CRYPTOCOCCUS CURVATUS</i> .....	<b>193</b>
4.1. Introduction.....	195
4.2. Material and methods.....	196
4.2.1. Experimental set-up .....	196
4.2.2. Culture preparation.....	197
4.2.2.1. Strain .....	197
4.2.2.2. Medium culture.....	198
4.2.2.3. Feed medium used for continuous culture .....	198
4.2.3. Inoculum preparation.....	198
4.2.4. Submerged fermentations .....	198

4.2.4.1. Fed-batch culture for lipid production .....	198
4.2.4.2. Continuous culture .....	199
4.2.5. Analytical methods.....	199
4.2.5.1. Determination of dry cell weight and turbidity.....	199
4.2.5.2. Determination of acetic acid concentrations .....	199
4.2.5.3. Measurement of ammonium nitrogen.....	200
4.2.5.4. Measurement of monosaccharide concentration.....	200
4.2.5.5. Cellular lipids extraction and analysis of fatty acid composition .....	200
4.2.6. Determination of $K_{La}$ .....	201
4.2.7. Numerical methods .....	201
4.3. Results and discussion.....	202
4.3.1. Development of a lipid production model .....	202
4.3.1.1. Biological model .....	202
4.3.1.2. Bioreactor model.....	204
4.3.2. Calibration of the lipid production model by a fed-batch culture .....	205
4.3.3. Determination of continuous culture parameters of the oleaginous yeast <i>C. curvatus</i> for cell mass and lipid production.....	208
4.3.3.1. Numerical identification of the most suitable C/N ratio for growth and lipid production in continuous culture.....	208
4.3.3.2. Identification of the most suitable dilution rate .....	209
4.3.4. Continuous culture of <i>C. curvatus</i> on acetic acid .....	212
4.3.4.1. Growth phase .....	212
4.3.4.2. Lipid production phase .....	217
4.3.5. Fatty acids profile of lipids obtained the continuous culture .....	218
4.4. Conclusions.....	219
5. DISCUSSION .....	<b>221</b>
5.1. Résultats principaux obtenus au cours du Chapitre IV .....	221
5.1.1. Simulations de cultures continues et identification de paramètres opératoires influençant la production de lipides .....	221
5.1.2. Influence d'une limitation par l'oxygène .....	221
5.4. Conclusions.....	228
<b>CHAPITRE V : Culture de levures oléagineuses sur du surnageant de culture anaérobie : faisabilité du bioprocédé à deux compartiments.....</b>	<b>229</b>
1. AVANT-PROPOS DU CHAPITRE V .....	<b>230</b>

2. CROISSANCE DE LA LEVURE OLEAGINEUSE <i>CRYPTOCOCCUS CURVATUS</i> SUR UN SURNAGEANT DE CULTURE ANAEROBIE .....	<b>231</b>
2.1. Utilisation des AGVs comme sources de carbone pour la production de biomasse levurienne .....	231
2.2. Recherche des nutriments nécessaires à la croissance de la souche.....	234
3. PROOF OF CONCEPT FOR BIOREFINERY APPROACH AIMING AT TWO BIOENERGY PRODUCTION COMPARTMENTS, HYDROGEN AND BIODIESEL, COUPLED BY AN EXTERNAL MEMBRANE .....	<b>237</b>
3.1. Introduction.....	238
3.2. Materials and methods .....	240
3.2.1. Microorganisms.....	240
3.2.2. Hydrogen production by dark fermentation .....	241
3.2.2.1. Medium culture.....	241
3.2.2.2. Hydrogen production from glucose .....	241
3.2.2.3. Analytical methods for gas phase .....	241
3.2.3. Membrane module.....	241
3.2.4. Lipid production by the oleaginous yeast <i>C. curvatus</i> using VFAs as carbon source .....	242
3.2.4.1. Medium culture.....	242
3.2.4.2. Inoculum preparation.....	242
3.2.4.3. Submerged fermentation .....	242
3.2.5. Analytical methods.....	243
3.2.5.1. Determination of dry cell weight and turbidity.....	243
3.2.5.2. Determination of glucose and volatile fatty acids concentrations .....	243
3.2.5.3. Measurement of ammonium concentration.....	243
3.2.5.4. Cellular lipids extraction and analysis of fatty acid composition .....	243
3.2.5.5. Prediction of biodiesel parameters .....	244
3.3. Results and discussion.....	246
3.3.1. Dark fermentation process.....	246
3.3.1.1. Biohydrogen production .....	246
3.3.1.2. Volatile Fatty Acids production .....	247
3.3.2. Membrane filtration.....	248
3.3.3. Use of supernatant by <i>Cryptococcus curvatus</i> .....	250
3.3.3.1. Cell mass production .....	250
3.3.3.2. Lipids production.....	251
3.3.3.3. Fatty acids profile and predictions of the biodiesel quality .....	253
3.3.4. Comparison with other biorefinery studies .....	255

3.4. Conclusions.....	258
<b>4. DISCUSSION .....</b>	<b>259</b>
4.1. Discussion autour des résultats obtenus.....	259
4.2. Limites posées par l'emploi d'un surnageant de culture anaérobie .....	261
4.3. Méthodes envisageables pour la concentration des AGVs .....	263
4.2.1. Augmentation de la concentration d'AGVs au cours de la fermentation anaérobie.....	263
4.2.2. Méthodes de séparation des AGVs .....	263
4.4. Conclusions.....	270
<b>Conclusions générales et perspectives .....</b>	<b>271</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>277</b>
<b>Sites internet.....</b>	<b>294</b>
<b>Liste des publications .....</b>	<b>296</b>
<b>Liste des communications.....</b>	<b>297</b>
<b>Communications orales .....</b>	<b>297</b>
<b>Communications par affiche .....</b>	<b>297</b>



## LISTE DES FIGURES

Figure I-1. Distribution de la consommation de pétrole aux Etats-Unis en 2013 (U.S. Energy Information Administration, 2013). .....	32
Figure I-2. Classification des biocarburants (Nigam and Singh, 2011). .....	34
Figure I- 3. Voies de production des biocarburants de deuxième génération (IFPEN). .....	35
Figure I-4. Chaîne de valorisation globale de la biomasse par voies thermochimiques (Rapport Ineris, 2006).....	39
Figure I-5. Synthèse des avantages et inconvénients des différentes voies biologiques de production de lipides. ....	49
Figure I-6. Classification of biofuels (Nigam and Singh, 2011). .....	54
Figure I-7. Lipogenesis in yeast (Christophe et al., 2012).....	61
Figure I-8. Route of polyunsaturated fatty acids biosynthesis.....	75
Figure I-9. The anaerobic polyketide synthase pathway for DHA biosynthesis (Ghasemnezhad and Honermeier, 2008). .....	77
Figure I-10. Représentation schématique des mécanismes de transport des acides gras volatils à travers la membrane plasmique (d'après Casal et al., 2008).....	92
Figure I-11. Mécanismes de transport actif. ....	93
Figure I- 12. Cycles de Krebs, du 2-méthylcitrate et du glyoxylate et bêta oxydation du butyrate. Sont représentées les voies d'assimilation connues pour la consommation des trois principaux AGVs (acétate, propionate et butyrate) chez la levure (d'après Paiva et al., 2004).....	96
Figure I-13. Schéma du projet de bioraffinerie. ....	97
Figure II-1. Schéma du réacteur en mode de culture batch.....	110
Figure II- 2. Schéma du réacteur en mode de culture fed-batch. ....	112
Figure II- 3. Schéma du réacteur en mode continu. ....	116
Figure III-1. Schéma du procédé de couplage. ....	126
Figure III-2. Stratégies expérimentales en deux phases employées. ....	129
Figure III-3. Suivi de culture de <i>C. curvatus</i> en mode fed-batch séquentiel sur acétate. ....	130
Figure III- 4. Profils d'acides gras obtenus au terme de chacune des phases de croissance (sur glucose ou acétate) et d'accumulation de lipides sur acétate de la levure oléagineuse <i>C. curvatus</i> . ....	133
Figure III- 5. Suivi de culture en batch de <i>C. curvatus</i> sur acétate, préalablement cultivée sur acétate ou glucose.....	136

Figure III-6. Suivi de culture en batch de la levure oléagineuse <i>C. curvatus</i> cultivée sur acétate, à pH 6 ou à pH 7. ....	138
Figure III-7. Influence du rapport C/N sur la teneur et le rendement en lipides de <i>C. curvatus</i> cultivée sur acétate. ....	141
Figure III-8. Influence du rapport C/N sur la teneur en lipides et le rendement en lipides. ....	143
Figure III- 9. Results of a fed-batch cultivation of <i>Cryptococcus curvatus</i> in a 7-L fermenter. ....	158
Figure III-10. Comparison of the experimental values obtained during a fed-batch culture of <i>C. curvatus</i> on acetate and the values obtained from a dynamic model. ....	160
Figure III-11. Results of a fed-batch cultivation of <i>Cryptococcus curvatus</i> in a 7-L fermenter. ....	163
Figure III-12. Evolution des rendements en biomasse (privée de ses lipides), CO <sub>2</sub> , lipides et oses en fonction de la phase de culture. ....	167
Figure III-13. Bilan carbone de la culture en fed-batch de <i>C. curvatus</i> sur acétate. ....	169
Figure III- 14. Comparaison des résultats obtenus à l'issue des cultures de <i>C. curvatus</i> réalisées sur acétate et d'une culture de <i>C. curvatus</i> réalisée sur glucose (d'après Zhang et al., 2011). ....	170
Figure IV- 1. Schéma de la stratégie de culture en continu. ....	172
Figure IV-2. Représentation schématique des dispositifs utilisés pour les cultures en fed-batch (2a) et en continu (2b). ....	177
Figure IV- 3. Calibration du modèle de croissance. ....	184
Figure IV-4. Comparaison des valeurs expérimentales obtenues au cours d'une culture en fed-batch de <i>C. curvatus</i> et des données obtenues à partir du modèle de croissance. ....	185
Figure IV-5. Comparaison des valeurs obtenues à partir d'une culture en fed-batch de <i>C. curvatus</i> sur acétate et des valeurs prédites par le modèle. ....	189
Figure IV-6. Comparaison des valeurs expérimentales obtenues au cours d'une culture en fed-batch de <i>C. curvatus</i> et des données obtenues à partir du modèle de production de lipides. ....	191
Figure IV-7. Scheme of the biorefinery project. ....	197
Figure IV- 8. Comparison of values obtained from a fed-batch culture of <i>C. curvatus</i> on acetic acid and predictions. ....	207
Figure IV-9. Influence of the C/N ratio on chemostat results, obtained from simulations. ....	209
Figure IV-10. Influence of the dilution rate on chemostat results, obtained from simulations. ....	210
Figure IV-11. Influence of the dilution rate on chemostat results, obtained from simulations. ....	211
Figure IV-12. Results of a continuous cultivation of <i>Cryptococcus curvatus</i> in a 7-L fermenter. ....	213
Figure IV-13. Comparison of the values from a continuous culture of <i>C. curvatus</i> on acetic acid and predictions. ....	214

Figure IV-14. Suivi d'une culture en continu de la levure <i>C. curvatus</i> à partir d'acétate.....	222
Figure IV- 15. Comparaison des résultats de cultures de levures <i>C. curvatus</i> sur acétate selon des modes de culture en continu et discontinu présentées dans les chapitres III et IV. ....	224
Figure IV-16. Comparaison des rendements (16a) et des productivités volumiques horaire (16b) en biomasse et en lipides de la levure <i>C. curvatus</i> cultivée sur acétate en mode fed-batch et continu.	225
Figure IV-17. Obtention d'un litre de lipides levuriens à partir d'acétate selon les conditions de culture (fed-batch et continu) déterminées au cours de ce travail .....	227
Figure V-1. Schéma du bioprocédé envisagé pour la production d'hydrogène et de lipides microbiens à partir de déchets lignocellulosiques.....	230
Figure V-2. Bilan de la première série de cultures en batch. ....	232
Figure V-3. Bilan de la deuxième série de cultures en batch. ....	234
Figure V- 4. Scheme of the biorefinery concept.....	240
Figure V- 5. Biohydrogen production. ....	246
Figure V- 6. Lipid production from <i>C. curvatus</i> grown on VFAs as carbon source. ....	250
Figure V- 7. Comparison of fatty acids profiles obtained from various <i>Cryptococcus</i> cultures on VFAs and rapeseed oil profile.....	254
Figure V-8. Production d'hydrogène et de biodiesel à partir de biomasse lignocellulosique.....	260
Figure V- 9. Simulation d'une culture continue de <i>C. curvatus</i> .....	261
Figure V- 10. Séparation membranaire des AGVs à partir d'un milieu complexe (d'après Zacharof et al., 2016).....	268
Figure V- 11. Schéma du procédé de couplage. ....	269
Figure VI- 1. Valorisation de la biomasse lignocellulosique par production d'hydrogène et de lipides précurseurs de biodiesel et devenir des fractions résiduelles. ....	275

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1. Propriétés des biodiesel et diesel.....	37
Tableau I-2. Modèles de prédiction des caractéristiques du biodiesel, formulés à partir des compositions en acides gras.....	38
Tableau I-3. Principales plantes oléagineuses cultivées dans les pays des continents européen, américain et asiatique. ....	41
Tableau I-4. Comparaison des taux de croissance maximaux $\mu_{max}$ de différentes souches de microalgues et de levures. ....	45
Tableau I-5. Estimation des coûts de production des lipides par voie biologique.....	47
Tableau I-6. Example of cultivation of oleaginous microorganisms in different culture conditions and lipid production. ....	56
Tableau I-7. FAME composition of vegetable and microbial oils (Beopoulos et al., 2009a; Feofilova et al., 2010; Li et al., 2007; Ratledge, 1993; Zhu et al., 2002). ....	59
Tableau I-8. Lipid identification methods.....	70
Tableau I-9. Dietary sources of functional lipids. ....	74
Tableau I-10. Strains involved in GLA microbial production. TFA = Total Fatty Acids.....	80
Tableau I-11. Strains involved in DHA microbial production. TFA = Total Fatty Acids.....	81
Tableau I-12. Strains involved in EPA microbial production. TFA = Total Fatty Acids.....	82
Tableau I-13. Strains involved in ARA microbial production. TFA = Total Fatty Acids. ....	83
Tableau I-14. Summary of general PUFA enrichment processes (Ward and Singh, 2005). ....	86
Tableau I-15. Production de biomasse et de lipides par des levures oléagineuses utilisant des AGVs comme source de carbone.....	89
Tableau I-16. Forme, pKA et poids moléculaires des AGVs.....	91
Tableau II-1. Composition du milieu de culture PDA. ....	100
Tableau II- 2. Composition du milieu de culture liquide ....	101
Tableau II-3. Composition des milieux d'alimentation utilisés au cours de la culture en mode fed-batch séquentiel.....	102
Tableau II- 4. Composition des milieux d'alimentation utilisés au cours des cultures en mode fed-batch.....	103
Tableau II-5. Composition des milieux d'alimentation utilisés au cours des cultures en mode continu. ....	105
Tableau II- 6. Composition des surnageants issus de cultures anaérobies productrices d'hydrogène. ....	106

Tableau II-7. Composition des milieux de culture utilisés pour les cultures en fioles Erlenmeyer.....	107
Tableau II- 8. Composition des milieux utilisés au cours de ce travail. ....	108
Tableau II- 9. Récapitulatif des différentes stratégies de cultures utilisées lors des cultures en fed-batch en bioréacteur. ....	114
Tableau II- 10. Variables mesurées au cours de la culture.....	121
Tableau II- 11. Calculs des rendements massiques et molaires de culture. ....	121
Tableau II- 12.Modèles de prédiction des caractéristiques du biodiesel, formulées à partir des compositions en acides gras.....	122
Tableau II- 13. Valeurs de paramètres des esters méthylés d'acides gras ( <sup>a</sup> (Knothe, 2005) <sup>b</sup> (Lapuerta et al., 2010) <sup>c</sup> (Moser, 2009)).....	122
Tableau II- 14. Récapitulatif des manipulations présentées dans ce travail. ....	124
Tableau III-1. Synthèse des résultats obtenus pour les deux stratégies envisagées.....	132
Tableau III-2 Prédiction des valeurs d'indice de cétane, de densité, de viscosité cinématique, de chaleur de combustion, de stabilité oxydative et d'indice d'iode. ....	134
Tableau III-3. Comparaison des cultures de levures <i>C. curvatus</i> réalisées à différents pH.....	138
Tableau III-4. Comparison of lipid content and biomass, lipid and CO <sub>2</sub> yields obtained from yeast cultures grown on various substrates. ....	148
Tableau III-5. Comparison of the results of yeast cultures at various pH and carbon sources.....	156
Tableau III-6. Comparison of fatty acids profiles of microbial and vegetable oils. ....	164
Tableau IV-1. Nomenclature des variables et paramètres du modèle cinétique. ....	178
Tableau IV-2. Composition des éléments produits ou consommés au cours des cultures.....	181
Tableau IV-3. Données utilisées pour le développement du modèle de croissance et de production de lipides de <i>C. curvatus</i> cultivé sur acétate. ....	192
Tableau IV-4. Determination of the K <sub>La</sub> depending on agitation and aeration parameters in a 7L-bioreactor. ....	201
Tableau IV-5. Cell mass and lipid productivities and yields of oleaginous yeasts grown on various substrates using a fed-batch and a continuous modes.....	216
Tableau IV-6. Comparison of fatty acids profiles of microbial and vegetable oils. ....	220
Tableau IV-7. Comparaison des résultats obtenus suite à l'application d'une limitation par l'oxygène. ....	223
Tableau V- 1. Composition des milieux utilisés au cours de ce travail.....	232

Tableau V- 2. Prediction models of biodiesel parameters, based on their FAMES composition.....	245
Tableau V- 3. Parameters from literature for methyl esters of different fatty acids.....	245
Tableau V- 4. Report gas phase analysis .....	247
Tableau V- 5. Metabolites produced during dark fermentation and membrane filtration results of supernatant. ....	249
Tableau V- 6. Cell mass and lipid production by oleaginous yeasts on various renewable substrates. ....	252
Tableau V- 7. Predictions of cetane number, density, kinematic viscosity, heat of combustion, oxidative stability and iodine value. Comparison with European and American standards.....	255
Tableau V- 8. Comparison between biorefinery studies. ....	256
Tableau V- 9. Calcul sur une culture continue simulée (taux de dilution $0,04\text{ h}^{-1}$ ) .....	262
Tableau V- 10. Méthodes envisageables pour la séparation des AGVs du milieu de fermentation...	265



# **INTRODUCTION**



Le développement et la mise en œuvre de procédés de bioraffinerie sont incontournables afin de tendre vers une économie durable basée sur les ressources d'origine biosourcée. Le concept de bioraffinerie consiste à utiliser la biomasse lignocellulosique non comestible afin de produire des biocarburants et des produits chimiques qui sont, dans le cadre d'une raffinerie classique, produits à partir de combustibles fossiles. Contrairement au pétrole dont la disponibilité et la composition sont limitées, la biomasse lignocellulosique possède l'avantage de présenter une composition variée : cellulose, hémicellulose, lipides, lignine, amidon et protéines. Chacun de ces constituants peut ainsi être fonctionnalisé afin de produire des composés alimentaires ou non, ou des intermédiaires de produits agro-industriels. Ceci sous-entend le développement d'un ensemble complet de technologies spécifiques capables de convertir efficacement chaque fraction de la biomasse lignocellulosique en produits de haute valeur ajoutée. Ces fractions peuvent être utilisées directement mais peuvent être également converties par des procédés de transformation microbiens, chimiques ou enzymatiques. La conversion de ces fractions en produits de haute valeur ajoutée permet également de compenser le coût des biocarburants, d'améliorer l'économie de la bioraffinerie lignocellulosique, de minimiser le rejet de déchets et de réduire la dépendance des produits dérivés du pétrole. La bioraffinerie offre ainsi de nouvelles possibilités économiques pour l'agriculture et les industries chimiques par la production d'une grande variété de produits chimiques, de carburants de transport et d'énergie. La teneur relativement faible en énergie, la saisonnalité et la disponibilité géographique des matières premières sont cependant considérées comme étant des obstacles face à l'importante demande en énergie et en carburant.

Cette thèse fait partie d'un projet de bioraffinerie visant à valoriser la biomasse lignocellulosique par la production de biohydrogène et de lipides levuriens utilisables comme précurseurs de biocarburants. L'originalité de cette approche réside dans la mise au point d'un bioprocédé consistant à relier deux compartiments où se déroulent, dans un premier temps la fermentation anaérobie productrice d'hydrogène et d'acides gras volatils (acétate, propionate et butyrate) et dans un deuxième temps la culture aérobie de levures oléagineuses à partir d'AGVs pour la production de lipides. La fermentation anaérobie se déroule au sein d'un bioréacteur à membrane immergée qui permet, au cours de la culture, la séparation liquide/solide du milieu de culture anaérobie. Le surnageant ainsi filtré contient les AGVs dont une accumulation serait toxique pour le consortium anaérobie producteur d'hydrogène. Il est alors soutiré pour être apporté dans le deuxième compartiment, siège de la production de biomasse et de lipides levuriens. L'objectif global de cette thèse est de mettre au point un procédé de production de biomasse et de lipides efficace par la levure oléagineuse *Cryptococcus curvatus* à partir d'AGVs. L'une des difficultés associées à l'emploi de ce type de substrat est sa toxicité élevée vis-à-vis des microorganismes. Cette contrainte entraîne

alors la nécessité de piloter ce procédé de manière particulièrement fine afin d'envisager à terme une industrialisation de ce procédé.

Le travail retranscrit dans ce manuscrit est divisé en cinq chapitres. Le chapitre 1 est dédié à l'étude bibliographique, constituée de cinq sous-parties. La première sous-partie synthétise le contexte actuel de la production de pétrole et des biocarburants. La deuxième sous-partie met l'accent sur le biodiesel et ses caractéristiques. Elle s'intéresse également aux modes de production actuels et à venir de ce biocarburant. En particulier, la production de biodiesel par l'utilisation de lipides produits par des microorganismes oléagineux est rapportée dans la sous-partie 3. La sous-partie 4 s'intéresse à l'utilisation d'AGVs pour la production de biomasse et de lipides par des levures oléagineuses. Elle détaille les mécanismes d'entrée de ces molécules dans le microorganisme et leur prise en charge dans le métabolisme. Enfin la sous-partie 5 présente les objectifs de travail de cette thèse et les avancées scientifiques réalisées au sein du laboratoire.

Le chapitre 2 est dédié à la description des techniques et méthodes expérimentales utilisées au cours de cette étude.

Les résultats et discussions de ce travail sont subdivisés en trois chapitres. Le chapitre 3 s'attache à décrire les travaux réalisés sur l'influence de certains paramètres opératoires sur la production de biomasse et de lipides par la levure oléagineuse *Cryptococcus curvatus* cultivée selon un mode fed-batch. Le chapitre 4 présente la construction d'un modèle de croissance et de production de lipides de la levure *C. curvatus* à partir d'acétate. Ce modèle a permis de déterminer les paramètres opératoires favorisant la productivité en lipides lors de cultures en continu réalisées sur acétate. Une comparaison des différents modes de cultures disponibles pour la production de lipides et de biomasse est également abordée. Enfin, dans le chapitre 5, des cultures de levures oléagineuses réalisées à partir de surnageant de culture anaérobie productrice d'hydrogène sont présentées.

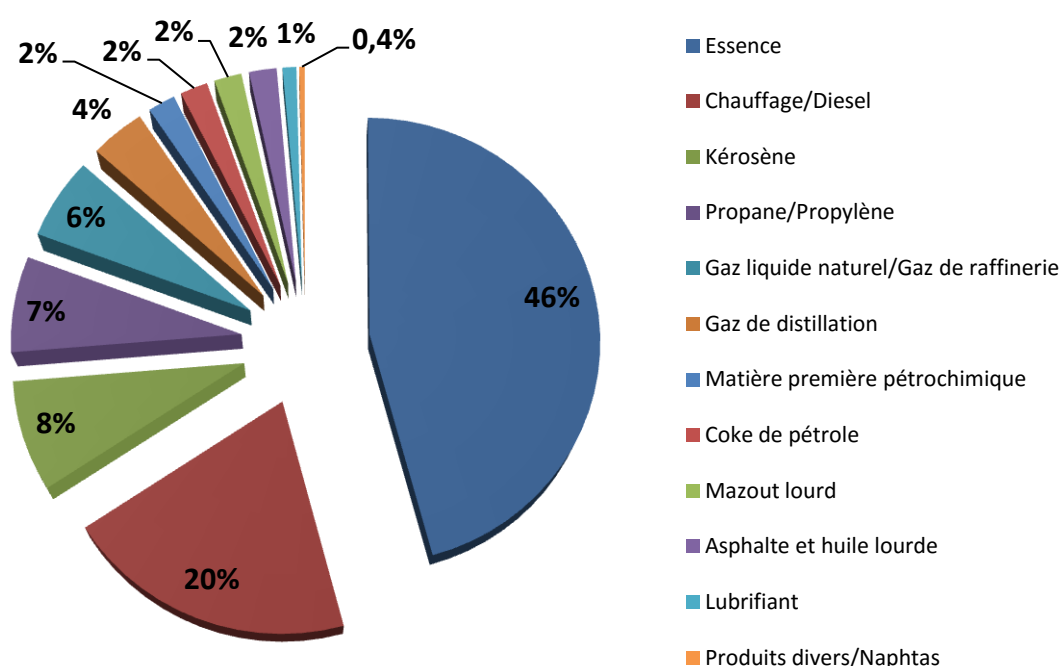


# **CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. CONTEXTE DE L'ETUDE

### 1.1. Consommation des énergies fossiles

En l'espace de dix ans, la consommation mondiale d'énergie primaire a augmenté de 2,1%. Le pétrole reste la source d'énergie la plus utilisée et représente, en 2014, 32,6% de l'énergie consommée (British Petroleum Statistical Review of World Energy, 2015). La Chine et l'Inde en particulier ont grandement contribué à cette inflation en augmentant leurs consommations de, respectivement, 2,6 et 7,1%. En 2014, cette consommation mondiale de pétrole représentait près de 90 millions de barils par jour. L'utilisation du pétrole réside principalement dans le domaine du transport. En 2013 aux Etats-Unis, plus de la moitié de la quantité de pétrole consommée au cours de l'année a été utilisée pour alimenter les moteurs de véhicules sous forme d'essence ou de diesel (Figure I-1).



**Figure I-1. Distribution de la consommation de pétrole aux Etats-Unis en 2013 (U.S. Energy Information Administration, 2013).**

L'augmentation de la demande énergétique va de pair avec l'augmentation de la population mondiale, notamment observée dans les pays émergents (Chine, Inde). De nombreuses interrogations se posent quant à la quantité de pétrole encore disponible. Cette notion de réserves pétrolières implique à la fois des réserves dont l'existence est établie avec des chances de récupération d'au moins 90% (Sibérie, Timan-Pechora) mais peut également englober les réserves probables, associées à des gisements identifiés et des gisements « encore à découvrir ».

Différentes prévisions quant à la fin annoncée du pétrole sont émises. Mille milliards de barils de pétrole ont été consommés jusqu'à présent. D'après l'ASPO (Association for the Study of Peak Oil), cette même quantité est présente dans les réserves tandis que deux mille milliards de barils seraient encore disponibles d'après l'USGS (United States Geological Survey). Quelle que soit la situation, face à l'augmentation des demandes énergétiques, le pétrole pourrait devenir limitant et la transition vers de nouvelles sources d'énergie est aujourd'hui une question cruciale.

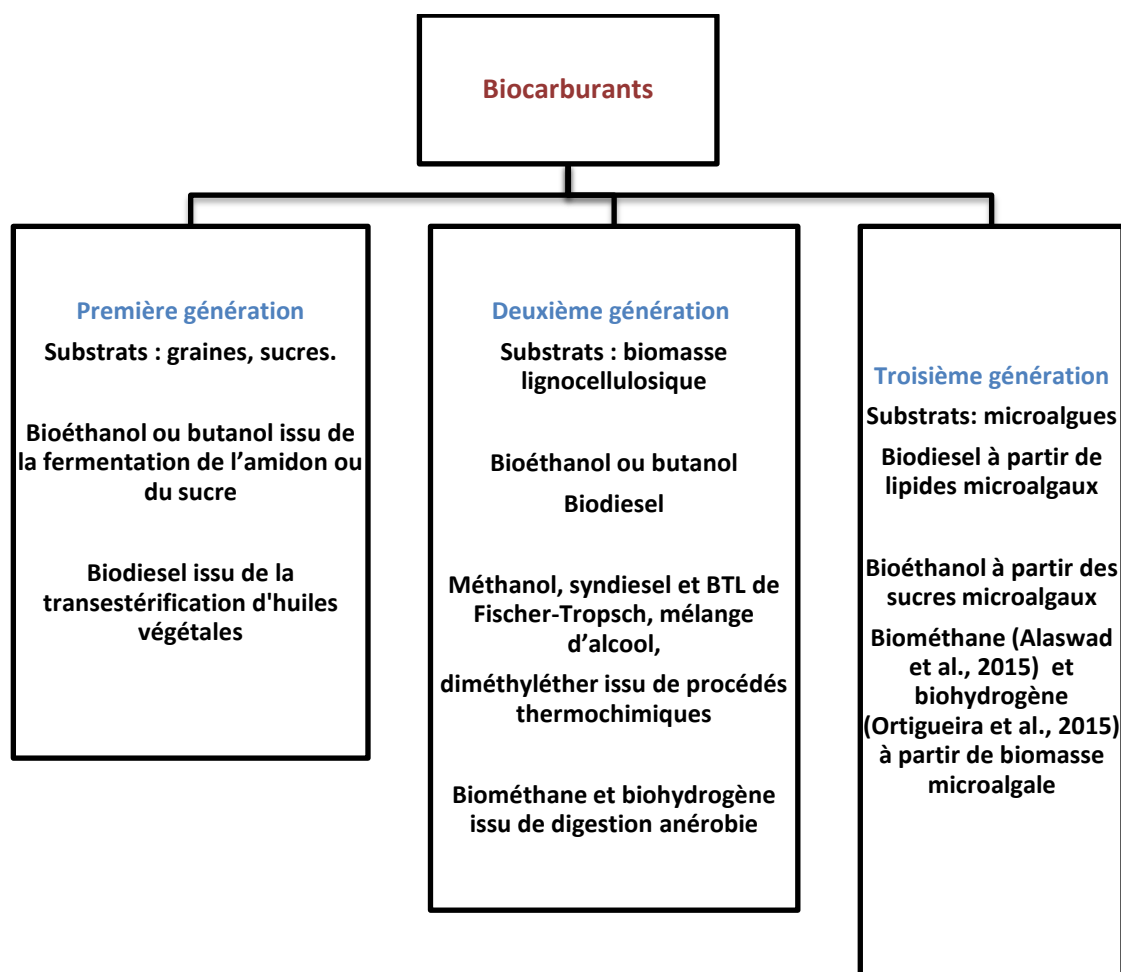
L'intensification de l'exploitation des carburants pétrolés est en relation directe avec la hausse des émissions de gaz à effet de serre observée au cours de ces dernières années. La combustion de ces carburants entraîne la production et la libération dans l'atmosphère de dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ), de méthane ( $\text{CH}_4$ ) et de protoxyde d'azote ( $\text{N}_2\text{O}$ ) majoritairement. Ces gaz absorbent une partie des rayons solaires et les redistribuent dans l'atmosphère, conduisant à une augmentation de la température mondiale. En 2011, 4,6 Gt d'équivalent  $\text{CO}_2$  ont été émis par l'Union Européenne, tous secteurs confondus. La moitié de ces émissions a été causée par les acteurs de l'industrie (manufacturière et productrice d'énergie), l'agriculture et la sylviculture. Le secteur des transports arrive en deuxième position avec 21% des émissions totales (IFP, Panorama 2015).

La prise de conscience mondiale de ces problématiques oriente désormais les recherches vers de nouvelles sources d'énergie, à la fois renouvelables et respectueuses de l'environnement. Parmi ces modes alternatifs de production d'énergie, les biocarburants sont aujourd'hui au cœur des enjeux énergétiques de demain.

## **1.2. Les biocarburants**

Les biocarburants sont définis comme étant des carburants liquides, solides ou gazeux obtenus à partir de biomasse. L'industrie des biocarburants est actuellement en pleine croissance grâce à des modes de production novateurs et durables. En comparaison avec les carburants d'origine fossile, la combustion des biocarburants provoque des émissions réduites de particules et de composés organiques volatils. Les émissions de soufre et de monoxyde de carbone dans l'atmosphère sont également plus faibles lorsque les biocarburants sont utilisés comme combustibles (Timilsina and Shrestha, 2011). En revanche, la combustion des biocarburants génère également une augmentation des émissions d'oxydes d'azote ( $\text{NO}_x$ ) qui ont un impact direct sur la santé humaine et l'environnement.

Une classification de ces biocarburants a été établie par Nigam et Singh (2011) en fonction de leur mode de transformation (Figure I-2).



**Figure I-2. Classification des biocarburants (Nigam and Singh, 2011).**

Les biocarburants peuvent être séparés en trois générations selon la nature du substrat initial.

La première génération de biocarburants secondaires rassemble le bioéthanol (et le butanol) et le biodiesel. Les sucres et l'amidon constituent la matière primaire à l'origine du bioéthanol et du butanol après une étape de fermentation alcoolique. Ces sucres sont issus de plantes cultivées telles que la canne à sucre ou la betterave sucrière. Les biodiesels sont quant à eux produits à partir d'huiles végétales. Actuellement, les biodiesels produits industriellement sont principalement issus d'huiles végétales provenant de plantes oléagineuses telles que le colza, le tournesol, le blé, le soja et les palmiers à huile.

Bien qu'efficaces, le problème émergeant de l'utilisation de ces biocarburants de première génération est celui de la compétition pour l'exploitation des terres cultivables (Nigam and Singh, 2011). En effet, l'inconvénient majeur de l'utilisation des plantes sucrières et oléagineuses dans cette filière est qu'elle entre en concurrence directe avec l'alimentation humaine et animale. L'une des

conséquences du détournement des surfaces agricoles vers la voie de production d'huiles destinées à la synthèse de biodiesels est l'augmentation du cours des matières premières (Ajanovic, 2011). Il en résulte également des problèmes environnementaux dans des pays tels que le Brésil ou l'Indonésie où ont lieu des déforestations massives de forêts primaires dans le but d'augmenter les surfaces agricoles destinées à la culture de cannes à sucre et de palmiers à huile (La Rovere et al., 2011; Zhou and Thomson, 2009).

Afin de pallier ces problèmes, l'utilisation de résidus lignocellulosiques non destinés à la consommation humaine (agricoles, forestiers, plantes non comestibles) a été envisagée comme substrat de biocarburants de deuxième génération. Cette deuxième génération est actuellement toujours en cours de développement et une mise à l'échelle industrielle est envisagée pour l'horizon 2020. Deux voies sont exploitées pour la production de ces biocarburants : la voie biochimique et la voie thermochimique (figure I-3). La voie biochimique fait appel à l'utilisation d'enzymes afin de dégrader la cellulose et de libérer les sucres qui seront ensuite fermentés pour produire de l'éthanol. La voie thermochimique peut se dérouler de deux façons différentes : (i) en passant par une étape de gazéification de la biomasse dans le but d'obtenir des hydrocarbures puis du gazole, (ii) via une étape de pyrolyse aboutissant à la production d'hydrocarbures pour fournir du gazole et/ou de l'essence. Se retrouvent également dans les biocarburants de deuxième génération les biodiesels produits par voie biologique, c'est-à-dire à partir de lipides accumulés au cours de cultures d'organismes oléagineux (levures, champignons) réalisées à partir de déchets renouvelables (lignocellulosiques, eaux usées, ordures ménagères, déchets alimentaires, etc).

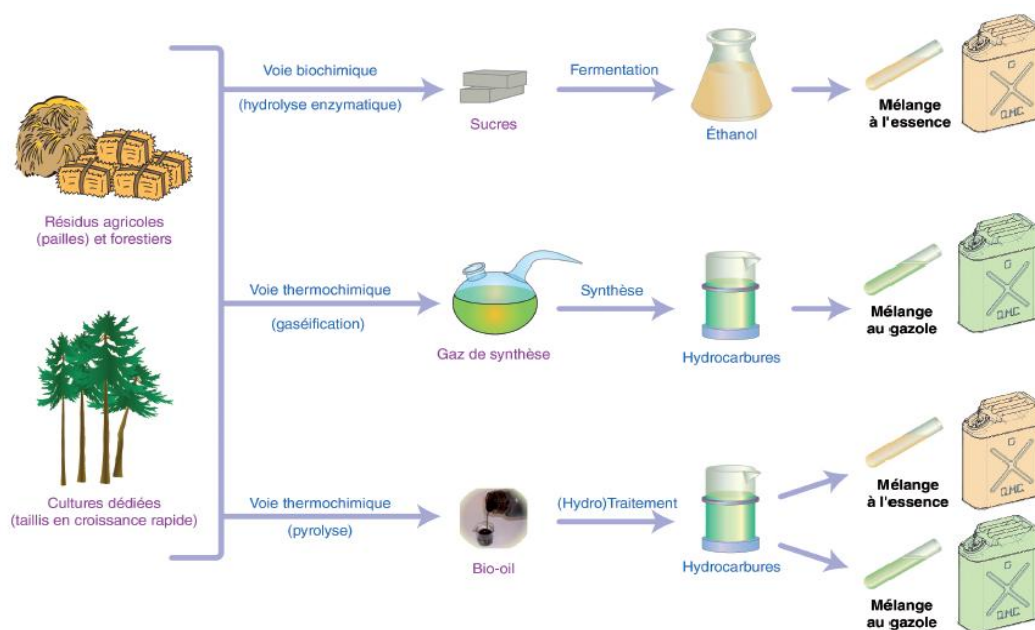


Figure I- 3. Voies de production des biocarburants de deuxième génération (IFPEN).



La troisième génération de biocarburants représente une voie prometteuse de production d'énergie à long terme. Elle implique l'utilisation de microalgues oléagineuses capables de se multiplier et de synthétiser des lipides et des sucres à partir de CO<sub>2</sub>, permettant par exemple le recyclage de gaz produits par des usines ou des centrales thermiques. A l'échelle du laboratoire, les premiers résultats en termes de productivité en lipides annoncent des productivités à l'hectare supérieures à celle des plantes oléagineuses. Les microalgues constituent de ce fait des candidats alternatifs à la production de biodiesel. Ces microorganismes peuvent également synthétiser des sucres qui peuvent être fermentés pour produire du bioéthanol. La biomasse algale totale ou résiduelle peut également être valorisée par une production de biogaz. La production de méthane et hydrogène produit par digestion anaérobie de la biomasse algale résiduelle est d'ailleurs en cours d'étude (Alaswad et al., 2015; Ortigueira et al., 2015).

## **2. LE BIODIESEL**

En 2012, la production mondiale de biodiesel s'élevait à plus de 430 000 barils produits par jour (Données statistiques AIE). Cette augmentation fulgurante (seulement 15 000 barils/jour en 2000) s'explique par l'engouement soudain pour ces carburants écologiques et le développement de structures dédiées à ces productions (cultures de plantes oléagineuses, multiplication des usines de production). L'Europe en particulier est un acteur incontournable de cette production puisqu'elle fournit à elle seule 40% de la production mondiale. La France produit quant à elle près de 33 000 barils de biodiesel par jour ce qui la classe derrière le premier pays producteur européen, l'Allemagne (plus de 54 000 barils journaliers produits). Cette production s'intensifiera certainement, puisque les scénarios prédits par l'Agence Internationale de l'Energie (AIE) et par l'Organisation des pays producteurs de pétrole (Opep) annoncent une augmentation de 40 à 60% de la consommation mondiale de pétrole d'ici 2040 (Rapports annuels AIE et Opep, 2014). Les biocarburants devront fournir 27% de la demande en carburants pour le transport routier en 2050 (contre 10% aujourd'hui). Pour fournir cette énergie, 30 millions d'hectares de terrain seront nécessaires (Feuille de route AIE). Afin de suivre cette feuille de route sans compromettre les besoins alimentaires de la population mondiale, il sera nécessaire de diversifier les voies de production du biodiesel ainsi que les matières premières.

### **2.1. Caractéristiques du biodiesel**

Les biodiesels utilisés industriellement sont constitués d'esters méthyliques d'acides gras issus d'huiles végétales. Les avantages de l'utilisation du biodiesel sont : (i) la disponibilité de la matière première (Demirbas, 2008), (ii) sa biodégradabilité (Zhang et al., 2003), (iii) une émission en gaz à effet de serre réduite de 50 à 80% par rapport au diesel conventionnel (FAO, 2008), (iv) un point

éclair plus élevé que le diesel conventionnel et pas de production de vapeurs explosives (Muniyappa et al., 1996), (v) une conservation possible dans les lieux de stockage de carburants déjà existant. Les caractéristiques notables du biodiesel et du diesel sont synthétisées dans le tableau I-1.

**Tableau I-1. Propriétés des biodiesel et diesel.**

	Biodiesel	Diesel Premier (Total)
Densité à 15°C (kg/m <sup>3</sup> )	875-890	820-845
Viscosité cinématique (mm <sup>2</sup> /s à 40°C)	4	2-4,5
Indice de cétane	54-58	46-51
Point éclair (°C)	100-135	55-120
Point de fusion (°C)	-12 à -22	*
Part de soufre (ppm)	<10	<10
Part d'eau (ppm)	<300	<200
Référence	(Geitmann, 2007)	Total

\* Le site du fournisseur indique que le point de trouble (température à laquelle se forment les premiers cristaux) se situe entre -5° et 5°C.

La **viscosité cinématique** correspond au quotient de la viscosité dynamique par la masse volumique du fluide. La viscosité cinématique des biodiesels est généralement plus élevée que celle des pétrodiesels et peut être à l'origine de dépôts se formant dans le moteur (Knothe and Steidley, 2005).

La **densité** du biodiesel a une influence sur l'émission de particules dans l'atmosphère. Plus cette densité est élevée et plus les émissions seront importantes. Les normes européennes imposent que les densités du biodiesel restent comprises entre 860 et 890 kg/m<sup>3</sup> (EN 14214).

L'**indice de cétane** évalue l'aptitude à l'auto-inflammation d'un carburant pour moteur diesel. Dans ce type de moteur, le carburant est injecté sous haute pression dans l'air comprimé et l'inflammation naît spontanément après un temps très court.

Le **point éclair** définit quant à lui la température la plus basse à laquelle un corps combustible émet suffisamment de vapeurs pour former, avec l'air ambiant, un mélange gazeux qui s'enflamme sous l'effet d'une source d'ignition.

Le **point de fusion** correspond à la température à laquelle un corps passe de l'état solide à l'état liquide. Ce dernier point est particulièrement important pour définir les propriétés de flux à froid du biodiesel, puisque l'un des risques majeurs en hiver est la cristallisation ou le figeage du carburant.

Le biodiesel est également caractérisé par sa **chaleur de combustion**, qui définit l'énergie libérée sous forme de chaleur lorsque le composé subit une combustion complète en présence d'oxygène.

L'**indice d'iode** renseigne sur la tendance du biodiesel à réagir avec l'oxygène à température ambiante. Une valeur faible indique que le biodiesel est moins susceptible à l'oxydation. La **stabilité oxydative** du biodiesel, exprimée en heure, est liée au nombre de doubles liaisons présentes dans les acides gras qui, une fois rompues, causent l'oxydation du biodiesel.

Il est important de souligner que chacune des caractéristiques du biodiesel citées ci-dessus est influencée par la composition en acides gras des huiles utilisées (Duarte et al., 2014; Knothe and Steidley, 2005; Pereyra-Irujo et al., 2009). Des modèles mathématiques ont été développés afin de prédire les caractéristiques des biodiesels, en particulier l'indice de cétane, la viscosité cinématique, la densité, la chaleur de combustion et l'indice d'iode à partir des compositions en acides gras présents (Pereyra-Irujo et al., 2009; Ramos et al., 2009). Ces modèles sont présentés dans le tableau I-2.

Le biodiesel peut être utilisé seul (B100) mais va nécessiter dans ce cas des modifications du moteur du véhicule afin d'éviter des problèmes de maintenance et de conserver sa performance. Il est plus souvent utilisé en mélange avec du pétrodiesel classique : B20 (20% biodiesel, 80% pétrodiesel), B5 (5% biodiesel, 95% pétrodiesel), B2 (2% biodiesel, 98% pétrodiesel). En France, le diester produit à partir d'huiles de tournesol et de colza est incorporé à hauteur de 7% dans le gazole.

**Tableau I-2. Modèles de prédiction des caractéristiques du biodiesel, formulés à partir des compositions en acides gras.**

Paramètre	Equation	Référence
Indice de cétane	$IC = \sum \frac{IC_{em} \%EM}{100}$	Ramos et al., 2009
Densité (kg/m <sup>3</sup> )	$\rho = \sum \frac{\rho_{em} \%EM}{100}$	Pereyra-Irujo et al., 2009
Chaleur de combustion (kJ/g)	$\Delta H_c = \sum \frac{\Delta H_{c_{em}} \%EM}{100}$	Pereyra-Irujo et al., 2009
Viscosité cinématique (mm <sup>2</sup> /s)	$\ln(v) = \sum \frac{\ln(v_{em}) \%EM}{100}$	Pereyra-Irujo et al., 2009
Indice d'iode (g <sub>I<sub>2</sub></sub> /100 g)	$II = \sum \frac{253,82 * DL * \%EM}{MM_{em}}$	Ramos et al., 2009
Stabilité oxydative (h)	$SO = \sum \frac{SO_{em} \%EM}{100}$	Ramos et al., 2009

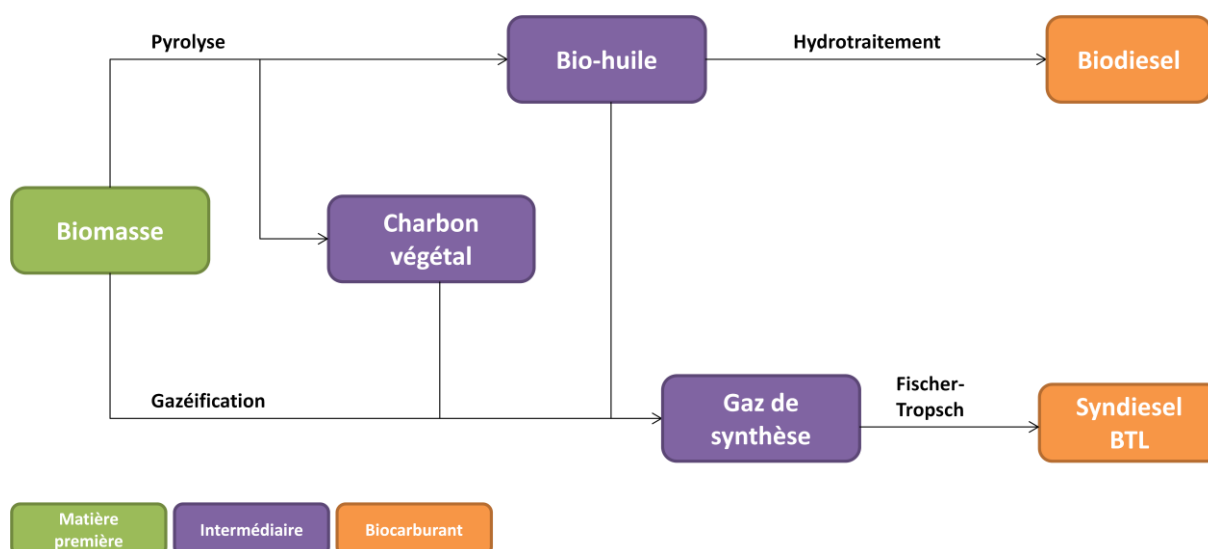
EM : ester méthylé d'acide gras. MM : masse molaire. DL : nombre de doubles liaisons. La masse atomique de deux atomes d'iode qui se lient à une double liaison est de 253,82 g/mol. La fraction de chacun des esters méthylés présents dans le biodiesel est représentée par %EM.

## 2.2. Mode de production du biodiesel

La production de biodiesel à partir de biomasse peut s'effectuer selon deux voies de synthèse : la voie thermo-chimique, qui fait appel à des procédés de transformation de la biomasse (gazéification et pyrolyse) ainsi que les voies biologiques, où les producteurs de lipides précurseurs de biodiesel sont des organismes oléagineux (plantes, microalgues et levures). A l'heure actuelle, seul le biodiesel produit à partir des huiles synthétisées par les plantes oléagineuses (voie biologique) est commercialisé. Le biodiesel de deuxième génération, obtenu par voies thermo-chimiques ou biologiques (utilisation de microorganismes oléagineux), n'est pas encore entré en voie d'industrialisation.

### 2.2.1. Voies thermo-chimiques

Les procédés thermo-chimiques permettent dans un premier temps de transformer la biomasse, solide et hétérogène, en combustibles gazeux ou liquides plus faciles à manipuler et à transporter. Ces voies thermo-chimiques sont à l'origine de la production de biodiesel de deuxième génération. Elles sont schématisées dans la figure I-4. Les matériaux produits (huiles de pyrolyse, gaz de synthèse) sont soit utilisés directement pour la production de chaleur et d'électricité, soit convertis en biocarburants liquides.



**Figure I-4. Chaîne de valorisation globale de la biomasse par voies thermochimiques (Rapport Ineris, 2006).**

#### 2.2.1.1. Gazéification de la biomasse

La gazéification est la transformation thermique (1000 à 1300°C) d'un combustible solide en gaz de synthèse (ou syngaz), formé principalement de monoxyde de carbone et d'hydrogène, utilisables

comme combustible gazeux ou intermédiaires de réaction. La gazéification se produit en présence d'un réactif gazeux lorsque la température diminue dans le réacteur vers 850-1000°C. Les gaz réactifs, aussi appelés oxydants, sont l'air, l'oxygène, la vapeur d'eau, ou un mélange. Ce syngaz peut par la suite être converti en hydrocarbures via la conversion de Fischer-Tropsch pour former par la suite du syndiesel ou du carburant BTL (Biomass to Liquid). D'autres applications sont également possibles, et parmi elles la combustion pour la co-génération de chaleur et d'électricité, la production de méthanol, de diméthyléther (DME) et d'hydrogène.

#### *2.2.1.2. Pyrolyse de la biomasse et formation de bio-oil*

La pyrolyse permet la conversion d'un combustible solide en trois phases valorisables: solide (charbon végétal), liquide (huile contenant des composés organiques condensables) et gazeuse (constituée de monoxyde de carbone, dioxyde de carbone, méthane, hydrogène...). Cette conversion s'effectue en l'absence de gaz de réaction (air, oxygène), et ce sont les conditions de chauffage qui l'orientent vers la phase privilégiée (gaz, solide ou liquide). La pyrolyse dite rapide (vitesse de chauffage proche de 100°C/s, température moyenne de 500°C, pression faible <1 bar) est favorisée puisqu'elle permet d'obtenir une phase liquide (huile, dite bio-oil) facilement manipulable et au rendement énergétique élevé.

La biomasse subit dans un premier temps un prétraitement (broyage et séchage). Dans le réacteur de pyrolyse, deux produits sont formés : la vapeur ainsi que des composés solides (suie et charbon de bois). Les vapeurs, composées de gaz et d'éléments volatils, sont récupérées et condensées. Cette condensation permet alors d'obtenir l'huile de pyrolyse (appelée également bio-oil), qui peut être stockée, brûlée ou convertie pour d'autres applications. Les résidus solides et les gaz non condensables sont brûlés pour fournir la chaleur nécessaire au procédé, ou valorisés en externe. Des verrous technologiques et économiques freinent encore l'industrialisation de tels procédés et la qualité des bio-huiles produites doit encore être sensiblement améliorée.

### **2.2.2. Voies biologiques**

#### *2.2.2.1. Plantes oléagineuses*

Il existe de très nombreuses plantes oléagineuses susceptibles de fournir la matière première pour la production de biodiesel de première génération. En Europe, les huiles dérivant du colza et du tournesol sont majoritairement employées pour cette production tandis qu'aux Etats-Unis, l'huile de soja et l'huile d'arachide sont davantage utilisées (Tableau I-3) (Atabani et al., 2012). Les matières premières doivent, dans l'idéal, répondre à deux attentes : des coûts de production faibles et une production à grande échelle. La disponibilité des plantes oléagineuses va dépendre du climat

environnemental, de la localisation géographique, de la nature du sol et des pratiques agricoles du pays.

**Tableau I-3. Principales plantes oléagineuses cultivées dans les pays des continents européen, américain et asiatique.**

Continent	Pays	Plantes
Europe	France	Tournesol, colza
	Italie	Tournesol, colza
	Allemagne	Tournesol, colza
	Espagne	Lin, tournesol
	Royaume Uni	Colza
	Suède	Colza
Amérique	Etats-Unis	Soja, arachide
	Canada	Colza, soja,
	Brésil	Soja, palmiers, ricin, coton
	Argentine	Soja
Asie	Indonésie	Palmier, jatropha, cocotier
	Malaysia	Palmier
	Philippines	Cocotier, jatropha
	Thaïlande	Palmier, jatropha, cocotier

La plupart des huiles utilisées pour la production de biodiesel sont des huiles comestibles (colza, tournesol, arachide, soja, etc). Actuellement, plus de 95% du biodiesel produit à l'échelle mondiale provient de ces huiles comestibles, en particulier le colza (84%), l'huile de tournesol (13%), l'huile de palme (1%), l'huile de soja et les autres sources (2%) (Atabani et al., 2012). Cependant, leur utilisation soulève de nombreuses questions : (i) le détournement de ressources alimentaires pour un usage automobile, (ii) la déforestation massive au profit de cultures de plantes oléagineuses, (iii) l'occupation de terres arables. De plus, le prix de la matière première (huile végétale) a augmenté depuis les 10 dernières années, ce qui impacte la viabilité économique de l'industrie du biodiesel (Balat and Balat, 2008). En outre, l'utilisation de ces huiles comestibles pour produire du biodiesel n'est pas possible à long terme en raison de l'écart croissant entre la demande et l'offre de ces huiles dans de nombreux pays. Par exemple, même en consacrant la totalité de la quantité de soja produite aux États-Unis à la production de biodiesel, cela ne répondrait qu'à 6 % de la demande en diesel (Hill et al., 2006).

L'une des solutions possibles pour réduire l'utilisation d'huiles comestibles pour la production de biodiesel est d'exploiter l'huile provenant de plantes non comestibles. Le jatropha en particulier est utilisé en Asie pour fournir l'huile utilisée pour la production de biodiesel (Silitonga et al., 2011; Siregar et al., 2015). L'utilisation du jatropha, dont la graine présente une teneur en huile de l'ordre

de 55%, permet de fournir près de 2000 barils d'huile à l'hectare et par an (Mohibbe Azam et al., 2005).

#### 2.2.2.2. *Microalgues*

Les algues sont des organismes photosynthétiques vivant en environnement humide (marin ou en eau douce) et représentent un groupe de 200 000 à plusieurs millions d'espèces. Ce groupe rassemble à la fois des eucaryotes et des procaryotes. Ils sont, dans ce dernier cas, appelés cyanobactéries. Leur activité photosynthétique leur permet de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique et d'utiliser le dioxyde de carbone pour la formation d'hydrates de carbone indispensables à la vie. Les algues font partie des végétaux et leur nomenclature est fixée par le Code international de nomenclature pour les algues, les champignons et les plantes (McNeill et al., 2011).

Les microalgues possèdent une taille variant du micron à la centaine de microns et sont caractérisées par leur capacité à synthétiser différents composés d'intérêt. En effet, certaines d'entre elles sont d'importantes productrices de polysaccharides (Marcati et al., 2014), d'antioxydants (Manivannan et al., 2012), de pigments tels que le bêta-carotène (Abalde et al., 1991), les phycobillyérythrines ou l'astaxanthine, de protéines utilisables comme émulsifiants dans l'industrie alimentaire (Ursu et al., 2014) mais également de lipides (Chen et al., 2015).

De nombreuses microalgues sont capables de synthétiser de hautes teneurs en lipides, parmi lesquelles *Botryococcus braunii* (Ruangsomboon, 2015), *Chlorella protothecoides* (Chen et al., 2015), *Dunaliella tertiolecta*, *Neochloris oleoabundans* (Morales-Sánchez et al., 2014) et des espèces du genre *Scenedesmus*. Les teneurs en lipide produites par ces microalgues peuvent représenter jusqu'à 70% de leurs poids secs (Chisti, 2007). Ces microalgues représentent un réel potentiel dans le domaine des biocarburants et des compléments alimentaires. En effet, les acides gras constitutifs des lipides produits par ces lipides sont de différentes sortes. Des acides gras à chaîne moyenne que l'on retrouve également chez les levures sont présents chez les microalgues (acides palmitique, palmitoléique, stéarique, oléique, linoléique et linoléique pour les plus représentés) et constituent une alternative intéressante aux huiles végétales actuellement employées dans le domaine du biodiesel (Chen et al., 2015). Ces microalgues peuvent donc fournir, à partir du CO<sub>2</sub> et de la lumière, des lipides pour la production de biodiesel de troisième génération.

Les microalgues accumulent également des acides gras polyinsaturés. En effet, une souche de *Nannochloropsis sp.* peut accumuler de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) représentant 30% des acides gras produits (Huerlimann et al., 2010). La teneur en acide docosahexaénoïque (DHA) de la

microalgue *Cryptocodinium cohnii* peut également atteindre 30% des acides gras produits (Swaaf et al., 2003).

Ces microorganismes accumulent des composés de réserve lorsqu'ils se retrouvent dans des conditions de stress. En effet, les limitations azotées (Morales-Sánchez et al., 2014), tout comme les chocs thermiques et osmotiques (Takagi et al., 2006) peuvent entraîner une augmentation de la production de lipides. Une limitation par la silice est susceptible de conduire à la production de lipides chez les diatomées (Yu et al., 2009). Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques, ainsi l'augmentation soudaine de l'intensité lumineuse peut également entraîner l'accumulation de lipides (Ho et al., 2012).

### 2.2.2.3. Levures oléagineuses

Une trentaine d'espèces de levures oléagineuses a été recensée et, parmi elles, les plus performantes en termes de production de lipides sont *Rhodospiridium toruloides*, *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus curvatus*, *Lipomyces starkeyi* et *Rhodotorula glutinis*. Les teneurs en lipides maximales pouvant être atteintes par ces levures varient entre 50 à 70% de leur poids sec (Cescut et al., 2014; Chi et al., 2011; Li et al., 2007).

Cette accumulation de lipides peut être causée par différents facteurs. La modification des conditions environnementales notamment de température, pH, aération mais surtout l'imposition de limitations nutritionnelles en azote, en soufre, en phosphore ou en fer (Hassan et al., 1996; Wu et al., 2011, 2010; Zheng et al., 2012) induit une importante production de lipides. Lorsque tous les nutriments nécessaires à la croissance des microorganismes sont présents dans le milieu de culture, le carbone est utilisé pour la production de quatre pools de molécules : acides nucléiques, glucides, lipides et protéines. Lorsqu'une limitation en éléments nutritifs a lieu, notamment en azote, mais que le substrat carboné dans le milieu reste présent en excès, une conversion préférentielle de la source carbonée en réserves lipidiques est alors observée (Ratledge and Wynn, 2002).

Les acides gras les plus fréquemment retrouvés dans ces réserves sont l'acide palmitique (C16), l'acide oléique (C18:1), l'acide stéarique (C18), l'acide linoléique (C18:2) et l'acide palmitoléique (C16:1). Ces profils d'acides gras sont similaires à ceux retrouvés dans certaines huiles végétales (notamment l'huile de palme et l'huile de jatropha) utilisées actuellement pour la production de biodiesel. Cette caractéristique fait de ces levures oléagineuses des producteurs alternatifs d'huiles utilisables pour la production de biodiesel.

Les levures oléagineuses possèdent également la capacité d'utiliser des substrats très divers, allant du sucre simple à des sources de carbone plus complexes (déchets lignocellulosiques, eaux usées,



etc). La dégradation de résidus lignocellulosiques et leur conversion en lipides microbiens contribuent à fournir la matière première pour la production de biodiesel de deuxième génération.

#### *2.2.2.4. Analyse et comparaison économique des voies biologiques de productions de biodiesel*

##### *2.2.2.4.1. Nature de la source de carbone et d'énergie*

Les plantes oléagineuses et les microalgues ont l'avantage d'être photosynthétiques et autotrophes. Elles ont donc naturellement la capacité à utiliser le carbone inorganique issu du CO<sub>2</sub> pour synthétiser leur propre matière organique, offrant ainsi des possibilités de valorisation à ce gaz à effet de serre. La plupart des programmes de recherche concernant la production de lipides microalgaux se concentre d'ailleurs principalement sur la production de biodiesel à partir de microalgues de métabolisme autotrophe. Toutefois, beaucoup de travaux sont également en cours sur l'utilisation de microalgues en hétérotrophie. *Chlorella protothecoides* par exemple est capable de croître et d'accumuler des lipides à partir de déchets organiques tels que des hydrolysats de tubercules de topinambour (Cheng et al., 2009), des hydrolysats d'amidon de manioc (Wei et al., 2009) ou du glycérol dérivé de la production de biodiesel (Chen and Walker, 2011).

##### *2.2.2.4.2. Cinétique de croissance et productivité*

Les levures oléagineuses se caractérisent par des taux de croissance élevés, qu'elles soient cultivées sur des substrats simples de type glucose ou plus complexes tels que les acides gras volatils. Les temps de génération sont par conséquent courts et plusieurs doublements par jour sont possibles.

Les taux de croissance maximaux des microalgues sont comparativement aux levures plus faibles, que ce soit en autotrophie ou en hétérotrophie. Les temps de doublement peuvent aller d'un doublement par jour à un doublement tous les trois jours. D'autre part, les cultures de microorganismes à croissance faible peuvent être sujettes à la contamination par des microorganismes à croissance plus rapide, et voir leur population totalement supplantée par le germe contaminant. Une comparaison des cinétiques retrouvées dans la littérature est présentée dans le tableau I-4.

**Tableau I-4. Comparaison des taux de croissance maximaux  $\mu_{\max}$  de différentes souches de microalgues et de levures.**

	Souche	Mode de culture	Source de carbone	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Temps de génération (h)	Référence
Microalgues	<i>Chlorella vulgaris</i>	Batch	CO <sub>2</sub>	0,012	58	(Sydney et al., 2010)
	<i>Botryococcus braunii</i>			0,010	69	
	<i>Spirulina platensis</i>			0,009	77	
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>			0,0087	79	(Tang et al., 2011)
	<i>Scenedesmus obliquus</i>			0,037	19	
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>			0,041	17	
	<i>Chlorella protothecoides</i>	Batch	Glucose	0,036	19	(Chen and Walker, 2011)
			Glycérol pur	0,029	24	
			Glycérol dérivé de la production de biodiesel	0,031	22	
Levures	<i>C. curvatus</i>	Batch	Glycérol	0,43	1,6	(Meesters et al., 1996)
	<i>Y. lipolytica</i>	Batch	Glycérol	0,14	5	(André et al., 2009)
	<i>Y. lipolytica</i>		Glucose	0,27	2,6	(Ochoa-Estopier and Guillouet, 2014)
	<i>C. curvatus</i>	Batch	Acétate	0,28	2,5	(Bélignon et al., 2015)

Les concentrations en lipides accumulés dans les levures, les microalgues ou les plantes oléagineuses pouvant atteindre des valeurs assez similaires, la productivité en biomasse et en lipides est donc généralement à l'avantage de l'utilisation de levures. Bien que les technologies de culture et de production de microalgues soient en constante amélioration, la productivité des levures semble être un atout fort de ce mode de production.

#### 2.2.2.4.3. Coûts de production

Une analyse des données économiques disponibles dans la littérature sur les différentes voies de production biologique de lipides est synthétisée dans le tableau I-5. De façon générale, la production de biocarburants à partir de lipides microalgaux et levuriens n'est, à l'heure actuelle, pas encore compétitive d'un point de vue économique. L'évaluation des coûts associés à la production de lipides algaux se situe entre 1,6 et 12,6\$ au litre, bien que Ratledge and Cohen, (2008) aient estimé un coût

pouvant atteindre les 21\$/kg. Les levures semblent être une alternative plus économique puisqu'au kilogramme, les prix varient entre 0,11 et 3,2\$. Le coût final du biodiesel au litre provenant de lipides levuriens demeure cependant plus élevé que les biodiesels d'origine végétale et le diesel d'origine pétrolière. En considérant la diminution croissante des ressources fossiles ainsi que les inconvénients associés à l'emploi de plantes comestibles pour cette production de biocarburants, le prix élevé des biodiesels issus de lipides microbiens devrait, à terme, s'harmoniser avec ceux des biodiesels utilisés actuellement.

Une des solutions possibles à la diminution des coûts de production reste la valorisation de toutes les fractions de la biomasse ainsi que des déchets produits. Les microalgues étant des organismes producteurs de protéines, pigments et polysaccharides, de nombreux programmes de recherche s'intéressent à l'utilisation de chacune de ces molécules à haute valeur ajoutée. De la même façon, les fractions résiduelles des cultures de levures peuvent être réutilisées de différentes manières, (i) en tant que substrat pour la culture de levures suivante, (ii) ou destinées à la nourriture animale puisque ces résidus sont riches en protéines. L'un des coproduits valorisable de la production de biodiesel est le glycérol qui se forme au cours de l'étape de transestérification. Cette molécule, lorsqu'elle est purifiée à plus de 99,5% est vendue 122€ au litre (donnée Sigma-Aldrich), mais peut aussi servir de substrat sous sa forme non purifiée pour de nombreuses applications de biotechnologie (propanediol,  $H_2$ , molécule plateforme...).

**Tableau I-5. Estimation des coûts de production des lipides par voie biologique.**

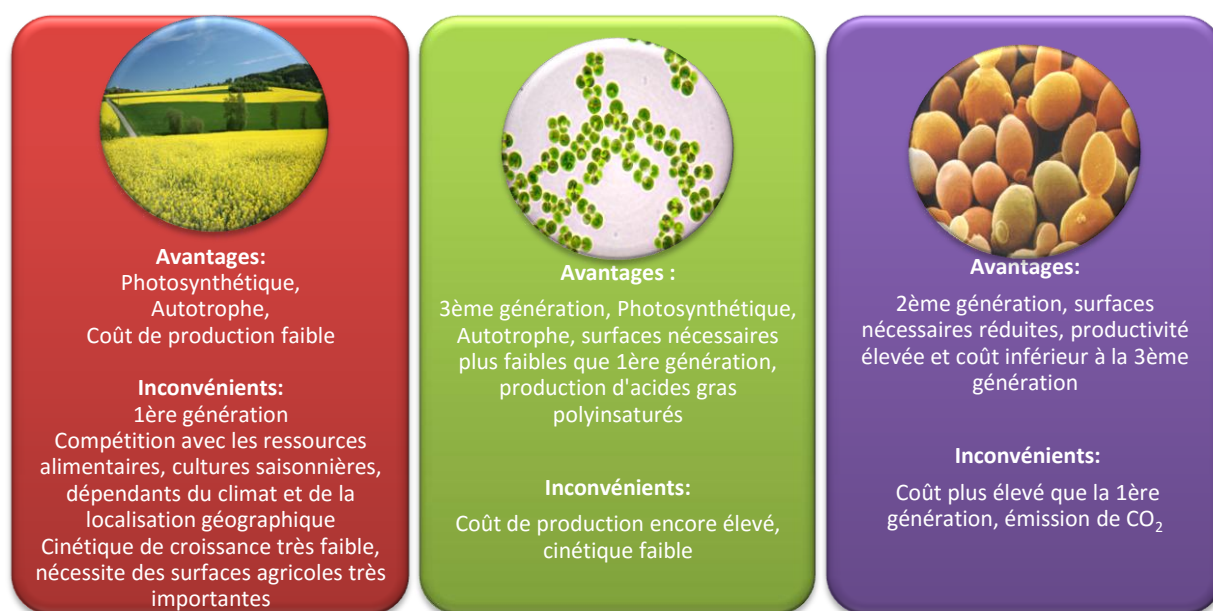
Souche	Substrat*	Structure	Teneur en lipides (%)	Coût final des lipides		Coût final du biodiesel (\$/L)	Référence
				\$/L	\$/kg		
<i>C. albidus</i>	AGVs (20\$/tonne)	Bioréacteur	50		0,16	0,30	(Fei et al., 2011b)
	AGVs (30\$/tonne)				0,49	0,70	
	AGVs (100\$/tonne)				0,95	1,26	
	Glucose (500\$/tonne)				3,15	3,79	
<i>C. curvatus</i>	Glucose (500\$/tonne)		21		2,19		(Seo et al., 2014)
	Résidu biomasse algale (gratuit)				0,19		
<i>C. curvatus</i>	Résidu biomasse levurienne (gratuit)		50		0,11		(Ryu et al., 2013)
	Résidu biomasse levurienne (34\$/tonne)				0,14		
	AGVs (30\$/tonne)				0,33		
<i>C. albidus</i>	AGVs (100\$/tonne)				1,11		(Vajpeyi and Chandran, 2015)
<i>R. toruloides</i>	Hydrolysats d'amidon (140\$/tonne)		67,5		3,4		(Koutinas et al., 2014)
<i>C. vulgaris</i>	CO <sub>2</sub>	Bassin ouvert	50	6,29	6,74**		(Sawaengsak et al., 2014)
		Photobioréacteur		12,63	13,55**		
Microalgues	CO <sub>2</sub>	Bassin ouvert	25	3,21-4,10	3,43-4,39**		(Rogers et al., 2014)
Microalgues	CO <sub>2</sub>	Bassin ouvert	20	0,72	0,77**		(Taylor et al., 2013)

Souche	Substrat*	Structure	Teneur en lipides (%)	Coût final des lipides		Coût final du biodiesel (\$/L)	Référence
				\$/L	\$/kg		
Microalgues	CO <sub>2</sub>	Etang ouvert	25	3,49	3,73**		(Richardson et al., 2012)
		Photobioréacteur		8,67	9,28**		
Microalgues	CO <sub>2</sub>	Etang ouvert	25	2,38	2,55**		(Davis et al., 2011)
		Photobioréacteur		5,06	5,41**		
Microalgues	CO <sub>2</sub>	Etang ouvert	30	1,62	1,73**		(Chisti, 2007)
		Photobioréacteur		2,08	2,23**		
Huile de jatropha					0,76		(Seo et al., 2014)
Huile de soja					0,77		
Huile de tournesol					1,06		
Huile de soja					1,36	1,28	(Fei et al., 2011b)
Huile de ricin					1,16	1,52	

\*Le prix du substrat est indiqué entre parenthèses

\*\*Les valeurs disponibles dans la littérature concernant les coûts de production des lipides sont exprimées en \$/kg pour les lipides levuriens et en \$/L pour les lipides algaux. Du fait de la densité des huiles inférieure à celle de l'eau, un litre d'huile ne pèsera pas un kilogramme. La densité de l'huile de jatropha, utilisée actuellement pour produire des biocarburants d'origine végétale et dont la composition est comparable à celle des lipides algaux (Ahmad et al., 2011) est de 0,932 (Pramanik, 2003) et cette donnée a été utilisée afin de convertir les valeurs exprimées en \$/L en \$/kg.

#### 2.2.2.4.4. Conclusions



**Figure I-5. Synthèse des avantages et inconvénients des différentes voies biologiques de production de lipides.**

Bien que les microalgues soient des microorganismes très intéressants grâce à leur capacité à synthétiser des lipides à partir de CO<sub>2</sub> et présentant des teneurs en lipides non négligeables, les levures semblent cependant se poser en leader pour la production de lipides (figure I-5). Grâce à des teneurs en lipides élevées, des productivités importantes, leur capacité à utiliser des substrats divers, allant du substrat simple (glucose) aux plus complexes (déchets), et un coût de production inférieur à celui des microalgues, les levures sont des candidats particulièrement performants pour la production de précurseurs de biodiesel. C'est ce modèle qui a été retenu dans cette étude pour la production de lipides à partir de substrats particuliers, les acides gras volatils.

Les caractéristiques des levures, en particulier le métabolisme sous-jacent à la production de lipides, les conditions d'accumulation, les différents types de cultures alloués à la production de lipides mais également les moyens développés pour produire et récupérer les composés d'intérêt, sont présentés dans un chapitre intitulé ***Microbial Single-Cell Oils: Precursors of Biofuels and Dietary Supplements***. Ce chapitre fait partie du livre ***Biotechnological production of natural ingredients for food industry***, dont les éditeurs sont Juliano Lemos Bicas, Mário Roberto Maróstica Jr., Glaucia Maria Pastore et publié par Bentham Science Publishers.

### 3. MICROBIAL SINGLE-CELL OILS: PRECURSORS OF BIOFUELS AND DIETARY SUPPLEMENTS

Vanessa Bélignon<sup>a,b</sup>, Gustavo Molina<sup>a,d</sup>, Gwendoline Christophe<sup>a,b,c</sup>, Christian Larroche<sup>a,b,c</sup>, André Lebert<sup>a,b,c</sup>, Pierre Fontanille<sup>a,b,c\*</sup>

<sup>a</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, BP20206, F-63174 AUBIERE cedex, France

<sup>b</sup> CNRS, UMR 6602, Institut Pascal, F-63171 Aubière, France

<sup>c</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, LABEX IMobS3, BP80026, F-63171 AUBIERE cedex, France

<sup>d</sup> Institute of Science and Technology – Food Engineering, UFVJM, Diamantina – MG, Brazil

**Abstract:** For centuries, men have used microorganisms for their activities and abilities to produce metabolites of interest such as antibiotics or pigments. Lipids are now under the spotlight as applications can be found in several domains. With the growing awareness of climate change and the depletion of petroleum resources, microbial lipids, which share similar fatty acids profiles with those of vegetable oils currently used in biofuels, compete as potential candidates for the development of green biodiesel. Oleaginous microorganisms can assure this production with substantial productivity, using various and low-cost types of substrates. Lipids formed by microorganisms can also be interesting from a dietary point of view, as some microorganisms are able to produce polyunsaturated fatty acids. These PUFAs, such as those belonging to the omega-3 and omega-6 series, are known for their benefits to human health. The use of microorganisms represents a promising way to produce PUFAs at lower cost and with a higher yield. This chapter discusses various potent microorganisms, especially bacteria and fungi, for single-cell oils production designed either for the energy field or the dietary domain, the metabolic ways involved, the culture conditions and the downstream processes of manufacturing.

---

\* **Address correspondence to Pierre Fontanille:** Axe Génie des Procédés, Energétique et Biosystèmes – Institut Pascal, UMR 6602 UBP/CNRS/IFMA. 24, avenue des Landais, BP 20206, 63174 Aubière cedex, France. Phone: +33 (0)4 73 40 74 27; fax: +33 (0)4 73 40 78 29. Email: pierre.fontanille@univ-bpclermont.fr

**Keywords:** Alpha-linolenic acid, Arachidonic acid, Biodiesel, Biofuel, Dietary supplement, Docosahexaenoic acid, Edible oil, Eicosapentaenoic acid, Essential fatty acid, Fatty acid, Fungi,

Gamma-linolenic acid, Linoleic acid, Lipid, Oleaginous yeast, Omega-3 series, Omega-6 series, Polyunsaturated Fatty Acid, Transesterification, Vegetable oil.

### **3.1. Introduction**

With an ongoing growth of the world's population, planned to reach 9.6 billion in 2050 according to experts, numerous challenges concerning food and energetic demands are expected. Currently, the daily world consumption of petrol reaches 84 millions of barrels, which amounts to 139,000 litres used per second. More than half of this quantity is used to feed vehicle motors.

One tenth is consumed in thermal power stations producing electricity whereas one twentieth is used for heating. However, the heavy exploitation of fossil fuels has led to a decrease in the world reserves. Consequently, a constant increase of the price of oil is observed reaching \$108 per barrel in September 2013.

Along with the drop of the fossil fuels reserves come several concerns about climate change. Combustion of fossil fuels causes the production and the release of greenhouse gases (GHGs) into the environment. Carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), methane (CH<sub>4</sub>) and nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) are the major GHGs produced. These gases absorb part of the solar rays and redistribute them as radiations in the atmosphere, leading to a rising of the global temperature. That is why the question of petrol replacement by a green substitute is more than ever a burning issue. One of the possible alternatives to traditional fuels is the use of biofuels. Biodiesel is defined as a mixture of fatty acid alkyl esters which can be produced from renewable sources and can be solid or liquid (Ghaly et al., 2010). The technical properties of biodiesel must be the availability (Demirbas, 2008), lack of negative effect upon the environment, biodegradability (Zhang et al., 2003), low potential risk (no explosive vapour) (Muniyappa et al., 1996) and easy transportability to existent storage places (Demirbas, 2006; Fischer et al., 2008; Zhang et al., 2003). With characteristics similar to petrodiesel (Sharma and Singh, 2009), biodiesel is an attractive alternative in the long run for its biodegradable, nontoxic and clean renewable qualities. So far, the raw materials tested for the production of biodiesel are vegetable and animal oils or fats and waste from cooking oils (Liu et al., 2008) but industrial biodiesel is mainly produced from vegetable oils (such as wheat, soy, rapeseed). Despite its efficiency, this type of biodiesel cannot be used on a global scale. The use of oleaginous plants to produce biodiesel is a threat to the human population because it diverts edible elements from their food role, creating a food security problem. The SCO (single cell oils) produced by oleaginous microorganisms and similar to vegetable oils appear as a response. They share a similar fatty acids profile as that of vegetable oils and can thus be substituted for petrodiesel after a transesterification step (Gwendoline Christophe et al., 2012).



The other emerging problem will be to provide enough food resources to an increasing population, while these resources are diminishing due to an over-exploitation of the planet: modern agriculture causes the impoverishment of soils, water exhaustion and chemical pollution, putting a pressure on the environment and the ecosystems. Searches for new food sources should particularly insist on finding alternatives to essential nutrients (carbohydrates, lipids, proteins, mineral salts, vitamins) present in “traditional” foodstuff (cereals, meat, milk, fish, vegetables and fruit). Among these fundamental elements, the essential fatty acids are of major importance. The essential fatty acids are polyunsaturated fatty acids (PUFAs) which cannot be synthesized by mammals and must be therefore brought by food (Certik and Shimizu, 1999). Two families of PUFAs exist: the omega-3 family and the omega-6 family. Their health benefits have been described and make them indispensable to a proper development (Alabdulkarim et al., 2012). The fatty acids composing the omega-3 family can be obtained by consuming oily fish such as salmon, white tuna and sardine. The omega-6 family is present in borage oil, evening primrose oil, blackcurrant seeds and also in mother’s milk. However, while mammals cannot produce these fatty acids by themselves, some microorganisms possess the ability to synthesize them. This competency creates a new prospect in the domain of food supplements, as we can therefore contemplate the option of producing and administering PUFAs to a larger number of people.

This chapter will discuss the single-cell oils produced by oleaginous microorganisms in particular fungi and bacteria which can be used either in the food industry or in the energy domain. It will present the different types of microorganisms involved in the production of the lipids of interest, their culture conditions and the production strategies of these oils. The downstream process of oil production will also be treated.

## **3.2. Single-cell oils as precursors of biodiesel**

### ***3.2.1. Bio-oils as biodiesel***

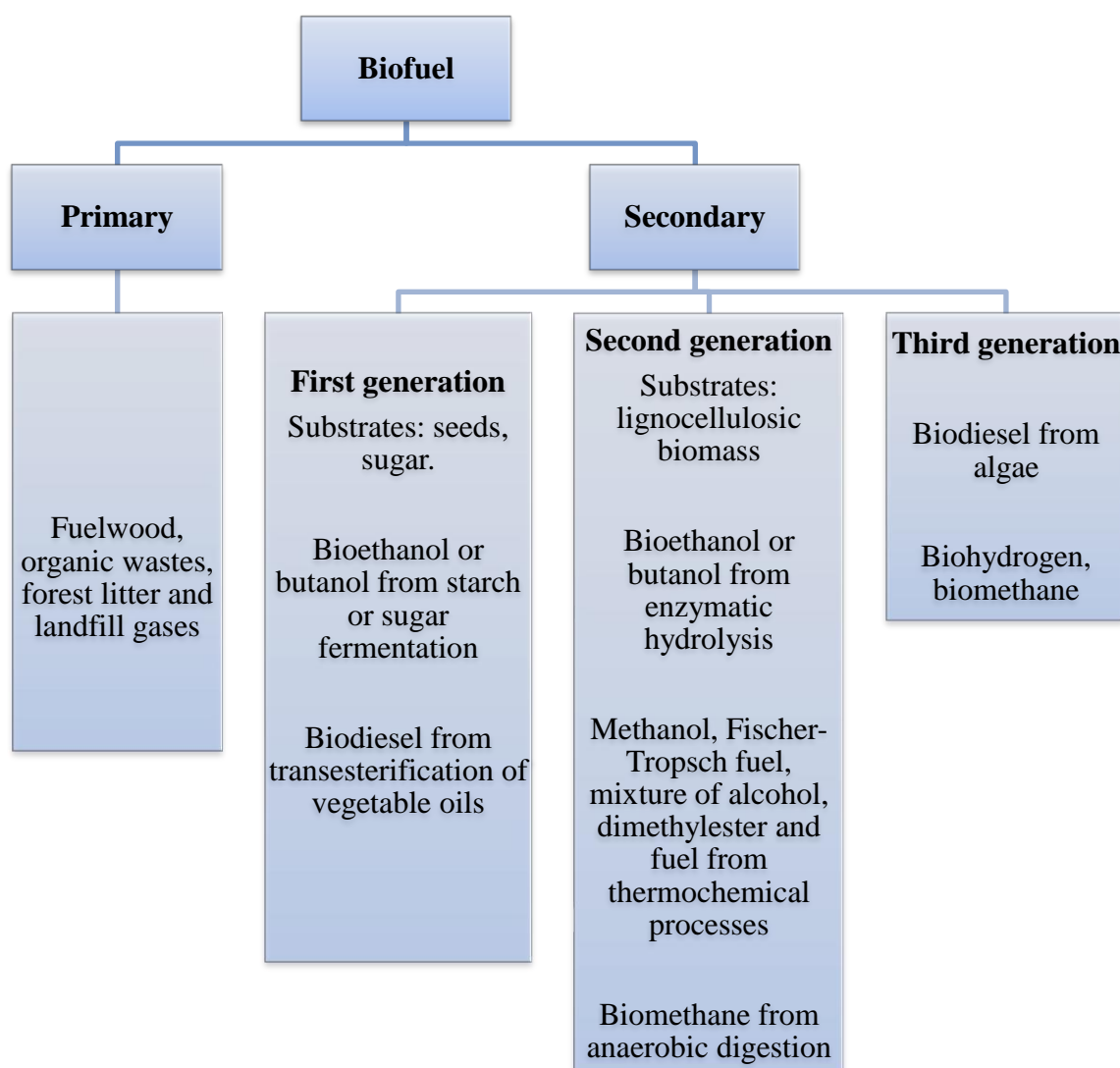
The rarefaction of fossil oils together with growing concerns about climate changes cause scientists to search for alternatives to petrol. Due to its omnipresence in the energy field, notably as fuels for vehicles, its replacement by green biofuels has been one of the aims of many studies. A classification of biofuels is presented in Figure I-6. Biofuels can be grouped in two categories: the primary one which is used in an unprocessed form contains fuel wood, organic waste, forest litter and landfill gases and the secondary one, which is itself divided into three generations. The first-generation biofuels use seeds or sugar as a substrate. The final products are bioethanol and butanol from starch and sugar fermentation, or biodiesel extracted from seeds oil. The major disadvantage of using this first-generation biofuel is the direct competition with human and animal food. Diversion of

agricultural land for the production of biofuels causes a rise of the raw materials price such as corn. Furthermore, the high interest for the first-generation biofuels induces environmental problems in countries such as Brazil and Indonesia, which observed a massive deforestation of their primary forests in order to increase agricultural lands of sugarcane and palm oil cultures.

The second-generation biofuels use lignocellulosic biomass as substrate and currently are in a development stage. The production of these fuels will not interfere with normal food production, and as such could help to resolve the biofuels versus food opposition: by using only non-edible parts of plants, biofuels produced from lignin and cellulose could allow the simultaneous production of food and biofuels in the same agricultural area.

The third-generation biofuels involve the use of microorganisms such as microalgae. Many substrates can be used by these microorganisms which turn carbon sources into lipids (and subsequently biodiesel). Biodiesel is constituted of fatty acids methyl esters. Just like crude oil, single-cell oil needs pretreatment before being used as a suitable alternative to diesel fuel. Four crude oil modifications are used: dilution or blending, microemulsion, pyrolysis and transesterification, of which the latter is the most commonly preferred treatment. The aim of transesterification is to convert free fatty acids, mono-, di- and triglycerides into alkyl esters having properties similar to the conventional diesel (Demirbas, 2008).

Therefore, biodiesel production using microbial oils could represent an alternative to producing bio-oils for biodiesel production. The progress of research in this field shows that the synthesis of lipids in organisms like fungi and bacteria is now known and controlled. A large number of strains have been described and selected for their great ability to produce lipids and the methods of assay and extraction of these molecules are now established (Subramaniam et al., 2010).



**Figure I-6. Classification of biofuels (Nigam and Singh, 2011).**

### **3.2.2. Potential microorganisms for the production of lipids**

All microorganisms possess the ability to produce lipids to maintain their membrane system. However, some of them can accumulate lipids more than 20% of their dry weights. These particular microorganisms are qualified as oleaginous and include various types of species such as yeasts, fungi, moulds and microalgae. Table I-6 summarizes the strains cited in literature. Among 600 known strains of yeasts, around 30 of them have been identified as oleaginous (Ratledge, 2002). The most productive yeasts are *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides*, *Cryptococcus curvatus* and *Yarrowia lipolytica*.

While non-oleaginous yeasts contain 5 to 10% of their dry weight as lipids implied in the membrane structure, oleaginous yeasts are known to accumulate 40 to 70% of their biomass as lipids mostly stored in lipid bodies as triglycerides. Some moulds such as Zygomycetes (*Mortierella* and *Cunninghamella*) also possess the ability of lipid accumulation (Papanikolaou et al., 2007).

The most common fatty acids in the lipid bodies are oleic acid (*cis*-9-octadecenoic acid or C18:1*n*9), linoleic acid (*cis*-9,12-octadecadienoic acid or C18:2*n*-6), palmitic acid (hexadecanoic acid or C:16), palmitoleic acid (*cis*-9-hexadecenoic acid or C16:1*n*-9) and stearic acid (octadecanoic acid or C18:0). The similarity of the fatty acids profiles produced by oleaginous microorganisms and those of vegetable oils currently used in the biofuels domain indicates that oleaginous microorganisms can represent interesting tools for the production of biodiesel (Table I-6). After esterification, the fatty acids methyl esters (FAME) contain high concentration of saturated fatty acids and good characteristics for combustion such as a high cetane number (Angerbauer et al., 2008). For example, the characteristics of the lipids produced by *Cunninghamella japonica* and *Cunninghamella echinulata* are in agreement with the European standards (EN 14214) for biodiesel production.

**Tableau I-6. Example of cultivation of oleaginous microorganisms in different culture conditions and lipid production.**

Strains	Reference	Lipids (wt. %)	Culture conditions		
			Substrate	Culture mode	Experimental conditions
<i>Aspergillus oryzae</i>	(Muniraj et al., 2013)	ca. 40	Potato processing wastewater	Flask	N and P limitations
<i>Candida sp.</i>	(Duarte et al., 2014)	55.02	Crude glycerol	Flask	Initial pH 6.5
<i>Cryptococcus curvatus</i>	(Seo et al., 2013)	23	Waste active sludge supernatant	Flask	
<i>Cryptococcus curvatus</i>	(Ryu et al., 2013)	46	Waste from brewery industry + glycerol	Flask	C/N 35
<i>Cryptococcus sp.</i>	(Chang et al., 2013)	62.2	Glucose	Flask fed-batch culture	
		60.9	Corn cob hydrolysate	Flask fed-batch culture	
<i>Lipomyces starkeyi</i>	(Gong et al., 2012)	50	Cellobiose	Flask	
		53	Glucose	Flask	
		57	Xylose	Flask	
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	(Ling et al., 2013)	47 ± 11.95	Non-sterile distillery water	Flask	COD of effluent : 2419 ± 152 mg/L
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	(Shen et al., 2013)	61.8 ± 0.9	Glucose	Continuous culture	Consumed C/N 61.6 - Dilution rate 0.02 h <sup>-1</sup>
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	(Uçkun Kiran et al., 2013)	40.9	Biodiesel by-products	Fed-batch culture in bioreactor	
<i>R. toruloides</i>	(Lian et al., 2013)	36.9	Glucose	Flask	C/N 27
<i>Rhodospiridium toruloides</i>		34.5	Levoglucosan	Flask	C/N 27
<i>Rhodotorula glutinis</i>		35.8	Glucose	Flask	C/N 27
<i>Rhodotorula glutinis</i>		39.7	Levoglucosan	Flask	C/N 27
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	(Huang et al., 2013)	19.5	Xylose, arabinose, glucose	Flask	Sugar composition similar to corn cob hydrolysate
		37.8	Corn cob acid hydrolysate	Flask	
<i>Trichosporon cutaneum</i>	(Chen et al., 2013)	47.1	Synthetic corn cob acid hydrolysate	Flask	C/N 180

		52	Glucose	Flask	
		37.5	Xylose	Flask	
		43.7	cellobiose	Flask	
		45.4	Corncob acid hydrolysate	Flask	C/N 100
<i>Trichosporon dermatis</i>	(Peng et al., 2013)	13.5	Wastewater from butanol production	Flask	
		35.6	Waste sweetpotato vines hydrolysates	Flask	
<i>Trichosporon fermentans</i>	(Zhan et al., 2013)	64.48	Sweetpotato hydrolysate + wheat straw hydrolysate	Flask	
		64	Crude glycerol	Flask	4% glycerol
		8-13	Serum latex	Flask	C/N 121
<i>Yarrowia lipolytica</i>	(Cheirsilp and Louhasakul, 2013)	14-20	Serum latex + molasses	Flask	C/N 327
		ca. 70	Palm oil mill effluent + crude glycerol 4%	Flask	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	(Wang et al., 2013)	48.7	Glucose	Flask	Disruption of the MIG1 gene
		40.69	Glucose + acetic acid	Fed-batch culture in bioreactor	C/N 50
<i>Yarrowia lipolytica</i>	(Fontanille et al., 2012)	38.06	Glucose + propionic acid	Fed-batch culture in bioreactor	C/N 50
		24	Glucose + butyric acid	Fed-batch culture in bioreactor	C/N 50
<i>Aspergillus awamori</i>	(Venkata Subhash and Venkata Mohan, 2014)	28.3	Modified sabourauds dextrose broth + glucose	Flask	pH 6, 28 °C
<i>Aspergillus terreus</i>	(Kamat et al., 2013)	ca. 8.6	Sugarcane bagasse	Flask	
<i>Mortierella isabellina</i>	(Gao et al., 2013)	71 ± 1.6	Xylose	Batch culture in flask	Molar ratio of N/yeast extract/urea : 2/3/1/0
<i>Mortierella isabellina</i>	(Zeng et al.,	66.68	Xylose	Flask	

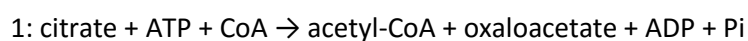
	2013)	± 2.22			
		66.50 ± 2.12	Glucose	Flask	
		4.84 ± 1.26	CMC	Flask	
		53	Wheat straw hydrolysate	Flask	
<i>Mortierella isabellina</i>	(Xing et al., 2012)	54.8	Corn fiber hydrolysates	Batch culture in flask	
<i>Mortierella isabellina</i>	(Ruan et al., 2012)	43.9	Glucose	Flask	C/N 70.3
		38.8	Xylose	Flask	C/N 66.8
<i>Mucor circinelloides</i>	(Mitra et al., 2012)	46	Corn-ethanol stillage	Bioreactor	
<i>Cunninghamella echinulata</i>	(Chatzifragko u et al., 2010)	72	glucose	Batch	C/N 264
<i>Cunninghamella echinulata</i>	(Fakas et al., 2009)	24	glycerol	flask	C/N 235
		58	xylose	flask	C/N 285
<i>Thamnidium elegans</i>	(Papanikolaou u et al., 2010)	70	Glucose, fructose, xylose	flask	C/N 240
<i>Thamnidium elegans</i>	(Chatzifragko u et al., 2011)	71	Glycerol	Flask	C/N 264
<i>Colletotrichum sp.</i>		36.4	Glucose	Flask	C/N 40
		40.1	Glucose	Flask	C/N 120
		46.8	Glucose	Flask	C/N 240
	(Dey et al., 2011)	44.5	Glucose	Flask	C/P 86
<i>Alternaria sp.</i>		40.1	Glucose	Flask	C/N 40
		49.6	Glucose	Flask	C/N 120
		55.1	Glucose	Flask	C/N 240
		51.4	Glucose	Flask	C/P 86

**Tableau I-7. FAME composition of vegetable and microbial oils (Beopoulos et al., 2009a; Feofilova et al., 2010; Li et al., 2007; Ratledge, 1993; Zhu et al., 2002).**

Species	Palmitic acid C16:0	Palmitoleic acid C16:1 $n$ -9	Stearic acid C18:0	Oleic acid C18:1 $n$ -9	Linoleic acid C18:2 $n$ -6	Linolenic acid C18:3 $n$ -3
<i>Lipomyces starkeyi</i>	33-56	2-6	5-14	26-55	0.1-3	0.12
<i>Lipomyces lipofera</i>	37	4	7	48	3	-
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	18-37	1	3-36	19-60	2-13	0-3.5
<i>Trichosporon pullulans</i>	15	Traces	2-10	57	7-24	1
<i>Cryptococcus curvatus</i>	17-25	-	12	55	8	2
<i>Cunninghamella echinulata</i>	16-19	-	12-14	40-48	4	3
<i>Mortierella isabellina</i>	20-27	1-4	2-6	44-54	4-18	3-8
<i>Yarrowia lipolytica</i>	11	6	1	28	51	1
Oil palm	32-59	-	1-8	27-52	5	Traces
Sunflower oil	3-10	-	1-10	14-65	20-75	Traces
Soya oil	7-14	-	1-6	19-30	44-62	4-11
Peanut oil	6-13	Traces	3-6	37-61	13-41	1
Cottonseed oil	27-28	-	1	13-18	51-57	Traces
Soybean oil	11	-	4	22	53	8
Rapeseed oil	3-14	-	1-2	56-64	22-26	8-10
Corn oil	12	-	1	25	61	1

### 3.2.3. Lipogenesis

The process of lipid accumulation can be divided into two parts: the first one is the production of acetyl-CoA and the second one involves the conversion of acetyl-CoA into lipids. The scheme for lipid production in yeast is shown in Figure I-7. Glucose via glycolysis leads to proton-linked pyruvate transported into the mitochondrion. In the mitochondrion, the enzyme pyruvate decarboxylative dehydrogenase converts pyruvate into acetyl-CoA which reacts with oxaloacetate to give citrate. Citrate, under aerobic conditions enters the Krebs cycle, leading to the synthesis of ATP via an electron transport chain in the mitochondrial membrane. Under lipid accumulating conditions (usually limitation of nitrogen source), citrate is exchanged via a citrate/malate antiport (citrate/malate translocase) with intracellular malate and is cleaved by the ATP: citrate lyase into acetyl-CoA and oxaloacetate according to reaction 1.

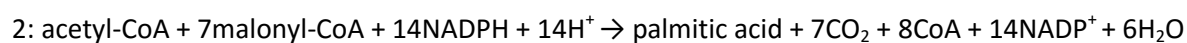




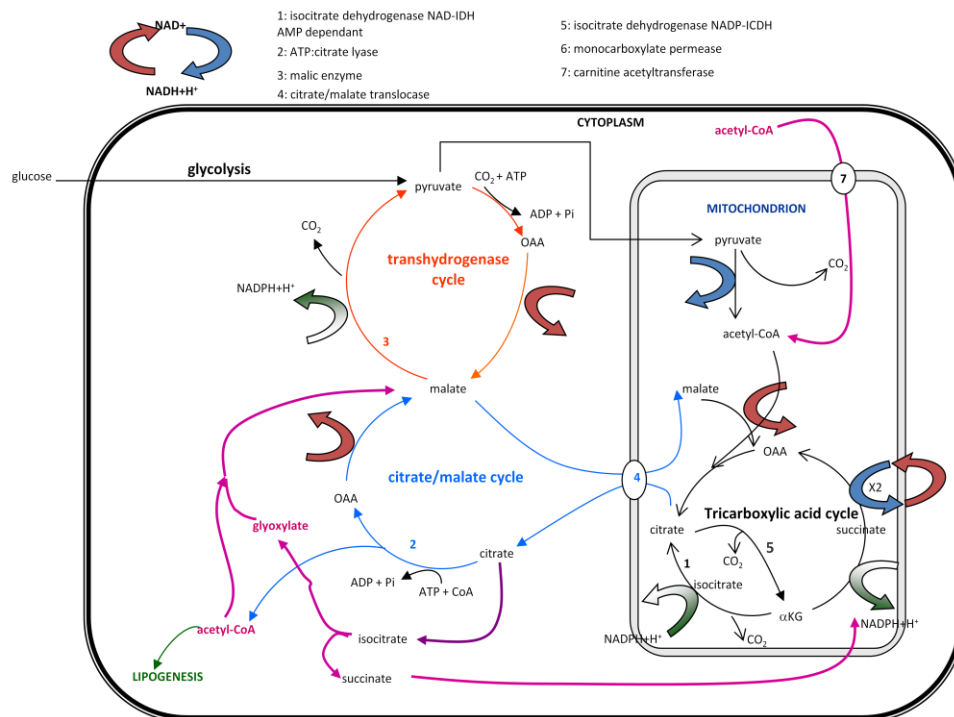
Acetyl-CoA obtained from the above reaction is converted into palmitic acid by lipogenesis pathway, which is the primer for longer-chained saturated or unsaturated fatty acids.

Acetyl-CoA acts as the primer for the synthesis of malonyl-Acyl Carrier Protein (ACP) and acetyl-ACP. Malonyl-CoA is obtained by the carboxylation of acetyl-CoA by an acetyl-CoA transacetylase or carboxylase and then transferred to an Acyl Carrier Protein (ACP) by malonyl transacetylase, with release of CoA. Malonyl-ACP allows the addition of  $g\ C_2$  units to the primer acetyl-ACP obtained by the transfer of the acetyl group of acetyl-CoA on an ACP with release of CoA. The next steps are operated by the fatty acid synthase (FAS). FAS is an enzymatic complex pretty much conserved in many species (Lomakin et al., 2007; Schujman and de Mendoza, 2008; Wen and Kerr, 2001). First, a  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase (KAS) adds the  $C_2$ -unit of malonyl-ACP on an acetyl ACP, decarboxylating the malonyl group and causing release of an ACP to give acetoacetyl-ACP. Acetoacyl-ACP reductase (KAR) leads to  $\beta$ -hydroxybutyryl-ACP by regeneration of  $NADP^+$  from NADPH and  $H^+$ . The dehydration of  $\beta$ -hydroxybutyryl-ACP by a  $\beta$ -hydroxyacyl-ACP dehydratase (HAD) produces a crotonyl-ACP which is reduced by an enoyl-ACP reductase (EAR) into butyryl-ACP with regeneration of a  $NAD^+$ . Elongation of the fatty acid chain is continued by the cycling addition of  $C_2$  unit in the form of the acyl group from malonyl-ACP (Ratledge, 2002; Ratledge and Wynn, 2002).

The overall equation is:



Then specific enzymes, desaturases and/or elongases convert palmitic acid into unsaturated or polyunsaturated fatty acids (PUFAs) or into longer fatty acyl chains. Desaturase catalyzes the introduction of double bond(s) into the fatty acid chain and elongase in a sequence similar to that of  $C_2$ -unit cycling addition. Biosynthesis of PUFAs is detailed in the second part of the chapter.



**Figure I-7. Lipogenesis in yeast (Christophe et al., 2012).**

Glucose via glycolysis leads to pyruvate. In the mitochondrion, the pyruvate decarboxylative dehydrogenase converts pyruvate into acetyl-CoA which reacts with oxaloacetate to give citrate. Citrate enters the Krebs cycle, leading to the synthesis of ATP via an electron transport chain in the mitochondrial membrane. Citrate is exchanged via a citrate/malate antiport (citrate/malate translocase) with intracellular malate and is cleaved by the ATP: citrate lyase into acetyl-CoA and oxaloacetate.

Acetyl-CoA is converted into palmitic acid by lipogenesis pathway, which is the primer for longer-chained saturated or unsaturated fatty acids. Acetyl-CoA also acts as the primer for synthesis of malonyl-Acyl carrier protein and acetyl-ACP.

### 3.2.4. Lipid accumulation conditions

In mainly oleaginous yeasts and fungi, lipid accumulation is triggered when the carbon source is present in excess and a nutrient becomes limiting in the growth medium. The limitation of many elements can result in lipid accumulation but usually it is nitrogen limitation which is used for this purpose because it is the most efficient one for the induction of lipid accumulation (Beopoulos et al., 2009b; Rattray et al., 1975; Wynn et al., 1999). Under nitrogen starvation, many microorganisms continue to assimilate the carbon source but the cell proliferation stops as nitrogen is required for protein and nucleic acid synthesis.

Under these conditions, the carbon flux is diverted towards lipid synthesis. Triacylglycerols begin to accumulate within discrete lipid bodies in the cells. Lipids formed have to be stored within the existing cells which can no longer divide. If non-oleaginous microorganisms are placed under the same conditions, then they either stop to proliferate or accumulate polysaccharides including starch, glycogen and various other glucans and mannans (Beopoulos et al., 2009b).

In oleaginous fungi, nitrogen exhaustion induces cascades of biochemical events leading to an accumulation of lipids, the first of them being an increase of AMP desaminase activity to compensate for the lack of nitrogen feeding (Beopoulos et al., 2009b). The first identifiable biochemical event following exhaustion of nitrogen from the growth medium is the activation of an AMP deaminase, which catalyses the following reaction:



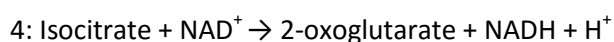
The activation of AMP deaminase results in the reduction of mitochondrial AMP concentration and the increase in cellular ammonium concentration. This reaction can only be a short-term solution to relieve the deficiency of nitrogen within the cells (Ratledge, 2002). The enzyme can be regarded as an ammonium scavenging enzyme and its enhanced activity during nitrogen limited conditions could be viewed as a means of garnering further nitrogen for protein and nucleic acid biosynthesis. This decrease in AMP concentration is not correlated with a decrease in ATP or ADP concentration. This decrease of AMP concentration happens when nitrogen is exhausted and just before lipid accumulates (Ratledge and Wynn, 2002).

### **3.2.5. Key enzymes of lipid accumulation**

Three enzymes are key enzymes for lipid accumulation: isocitrate dehydrogenase, ATP: citrate lyase and malic enzyme.

#### **3.2.5.1. Isocitrate dehydrogenase**

The decrease in AMP concentration inhibits the activity of isocitrate ( $\text{NAD}^+$ -dependent) dehydrogenase (IDH), which is one of the key enzymes for lipid accumulation (Ratledge and Wynn, 2002). The enzyme catalyses the following reaction:



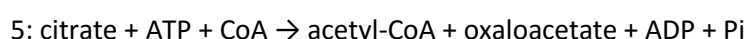
In oleaginous yeasts, the enzyme IDH has an absolute requirement for AMP directed lipid accumulation, where AMP acts as a positive effector via allosteric regulation. In non-oleaginous microorganisms, the enzyme has no such dependency (Ratledge, 2002). Cessation of IDH activity results in an accumulation of isocitrate, which is no longer oxidized by citric acid cycle. This isocitrate accumulation is rapidly equilibrated with citrate via enzyme aconitase. Mitochondrial citrate is then transferred out via malate/citrate translocase system (Ratledge, 2002).

In the cytoplasm, the excess of citrate inhibits the glycolytic enzyme phosphofructokinase (PFK) that would stop the glycolytic flux. This inhibition is released by  $\text{NH}_4^+$  ions and probably warrant pyruvate supply for lipid synthesis because  $\text{NH}_4^+$  fixation on PFK makes a stable complex before the exhaustion of nitrogen (Ratledge and Wynn, 2002) even when the  $\text{NH}_4^+$  ions concentration is not sufficient to ensure the synthesis of amino acids. Furthermore the release of  $\text{NH}_4^+$  ion by AMP desaminase

(reaction 3) allows the activity of PFK. When glutamate was used in place of ammonium ion for nitrogen feeding, for lipid accumulation in *Rhodospiridium toruloides* culture (Ratledge and Wynn, 2002), the intracellular concentration of  $\text{NH}_4^+$  ions was higher than it was with ammonia. Therefore the activity of enzyme PFK was not inhibited, thus, it may be an interesting way of keeping a high PFK activity and consequently a higher synthesis of lipids. Pyruvate availability for the lipid synthesis means that PFK as hypothesized by Ratledge and Wynn (2002) remains active or that another pathway leads to pyruvate supply from G3P. It may be possible that the pentose-phosphates pathway represents an alternative way to the Embden-Meyerhoff pathway. This pathway does not need ATP for uptake of glucose, at the time when the electron transport chain could not be active enough due to inhibition of the TCA cycle at the level of NAD-IDH. In yeast and fungi, the mitochondrial isocitrate dehydrogenase (IDH) depends on both,  $\text{NAD}^+$  and AMP. Two isoenzymatic forms of  $\text{NADP}^+$  dependent isocitrate dehydrogenase (ICDH) are present, one of them is cytoplasmic and the other is mitochondrial (Gálvez and Gadal, 1995). They ensure the supply of  $\alpha$ -ketoglutarate (precursor of amino acids) in the mitochondrion when nitrogen is not limited, and in the cytoplasm to produce the NADPH required for lipogenesis. Even if their activities are very low compared to  $\text{NAD}^+$  dependent ICDH (in acetate grown culture, the IDH/ICDH is equal to 4), the mitochondrial ICDH provides  $\alpha$ -ketoglutarate to the citric acid cycle, that allows electron transport chain ATP synthesis required to maintain cellular energetics.

### 3.2.5.2. ATP:citrate lyase

The citrate transported out of mitochondrion into cytoplasm is cleaved by an ATP-citrate lyase (ACL) to produce oxaloacetate and acetyl-CoA (reaction 5). This enzyme does not exist in non-oleaginous yeasts, such as *Saccharomyces cerevisiae* (Beopoulos et al., 2009b).



This reaction furnishes large amount of acetyl-CoA for fatty acid synthesis. The presence of ACL activity is strongly linked to the ability to store lipids. This particularity has been observed in yeasts, filamentous fungi and other oleaginous microorganisms (Certik and Shimizu, 1999; Meng et al., 2009; Ratledge, 2002). Only organisms able to produce more than 20% of triacylglycerols possess an ACL activity. Though the enzyme has been found in some non-oleaginous yeasts, they are not able to accumulate lipids beyond a little percent of their biomass (Ratledge, 2002, Ratledge and Wynn, 2002). Thus the enzyme is mandatory for lipid accumulation but its presence does not strictly imply that the microorganism is an oleaginous species. Hence the presence of ACL cannot be the sole criterion for an organism to be oleaginous.

### 3.2.5.3. Malic enzyme

In addition to continuous supply of acetyl-CoA, there must also be a supply of NADPH for fatty acid synthesis to occur. Fatty acid synthase (FAS) requires two moles of NADPH for every acetyl (or malonyl) unit added to the growing fatty acyl chain during lipid synthesis. Each of the two reductive steps in FAS: 3-ketoacyl reductase and 2,3-enoyl reductase, require one mole of NADPH (Ratledge, 2002). The NADPH for lipogenesis is provided by malic enzyme which catalyzes the following reaction (Wynn and Ratledge, 1997).



Though malic enzyme produces less than 15% of the total NADPH (the others being glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and cytosolic NADPH-isocitrate dehydrogenase) the NADPH produced is essential for lipid accumulation (Certik and Sakau, 1999). Malic enzyme would assume prime importance if a substrate such as pyruvate or even acetate is used in place of glucose. If the activity of the enzyme vanishes, either by inhibiting or mutation, then lipid accumulation stops. Thus malic enzyme is vital for the process of lipid accumulation (Ratledge and Wynn, 2002). Wynn et al. (1999) have also shown a strong correlation between the malic enzyme activity and the extent of lipid accumulation.

The lipid metabolism in many oleaginous yeasts is well-known today. Thanks to bioinformatic data, many genes implied in fatty acid synthesis in *Y. lipolytica* and *S. cerevisiae* are identified and lead to novel approaches to the engineering of unicellular microorganisms (Beopoulos et al., 2009b). This knowledge allows also a rapid screening of efficient strains for lipids production (Peralta-Yahya and Keasling, 2010).

### 3.2.6. Cultivation modes for lipid accumulation

For lipid accumulation in oleaginous microorganisms, different modes of biomass production can be considered: batch, fed-batch and continuous culture modes. The mode of culture is an important parameter that will be crucial for optimizing lipid production and will therefore have a direct economic impact on the process. The tools of chemical engineering will have to be mastered to develop the production process on an industrial scale.

#### 3.2.6.1. Batch operation

Batch cultivation refers to the culture of cells in a fixed volume of culture medium and under particular environmental conditions (e.g. temperature, nutrient type, pressure, agitation, aeration, etc). Most of the studies in literature have been done using this mode of culture (Table I-6) which simply allows to determine the influence of some parameters on lipid accumulation. For example, lipid production by oleaginous organisms can be triggered by a nutrient limitation (usually nitrogen)

(Li et al., 2007). Therefore, batch cultivations of oleaginous microorganisms are performed with a high C/N ratio to channel the extra carbon into lipid accumulation after the establishment of nitrogen limiting conditions. As long as the nitrogen is not depleted, the culture remains in the exponential phase and the biomass keeps on increasing. When the nitrogen concentration becomes very low, the growth almost stops and the culture enters the lipid accumulation phase.

The batch culture is often used in flask culture. However, a high initial glucose concentration can inhibit the microorganism growth and make it difficult to obtain a high cell density biomass. For example, for *Cryptococcus sp.* grown in flask containing 4% of glucose, the biomass reaches 9.4 g/L whereas an increased glucose concentration from 6 to 10% leads to a drop of biomass production to 6.6 g/L. This may be due to an inefficient consumption of the carbon source and the decrease of the specific growth rate (Chang et al., 2013).

In batch cultures, carbon substrates and minerals are initially added in the bioreactor with a high initial C/N ratio to induce lipid accumulation. Usually this ratio is 50:1 (Nigam, 2000). Nitrogen consumption starts right from the beginning of the culture. The rC/rN (residual carbon to residual nitrogen) ratio constantly increases, tending to infinity. But, after an active phase of lipids production, citric acid production is generally observed as a function of rC/rN ratio. This citric acid production results in a change of microbial metabolism and in the decrease the lipid yield from the carbon substrate. The consumed carbon to consumed nitrogen ratio has to be controlled to prevent citric acid secretion, hence the importance of monitoring rC/rN in fed-batch and continuous cultures.

### 3.2.6.2. Continuous operation

In a continuous culture, fresh nutrient medium is continuously supplied to a well-stirred culture and products and cells are simultaneously withdrawn. The C/N and rC/rN ratios in the culture medium are constant for a given dilution rate when the steady state is reached. In these conditions, lipid accumulation strongly depends on the dilution rate and molar C/N ratio of the growth medium (Ratledge, 1994; Ykema et al., 1986). The dilution rate ( $D$ ) is defined as the rate of the flow of the medium over the volume of culture in the bioreactor and is expressed in  $\text{h}^{-1}$ . Low dilution rates favours lipid accumulation, as shown by Shen et al. (2013). The yeast *R. toruloides* grown on glucose and under nitrogen limitation in a chemostat produces highest lipid concentration (5.36 g/L) and non-lipid cell mass concentration (3.32 g/L) at a dilution rate of  $0.02 \text{ h}^{-1}$ . By contrast, a dilution rate of  $0.2 \text{ h}^{-1}$  induces a drop of lipid concentration (0.21 g/L) and non-lipid cell mass concentration (1.42 g/L) indicating a change in production yields of biomass and lipids between the two dilution rates. The same case has been observed by Papanikolaou and Aggelis (2002) who determined the best dilution rate for *Y. lipolytica*'s growth. From  $D = 0.02 \text{ h}^{-1}$  to  $D = 0.03 \text{ h}^{-1}$ , a significant growth is

observed. However, high dilution rates resulted in significant amount of glycerol detected in the culture medium, meaning a lower usage of the carbon source. As for lipid yield, it reaches its highest value (0.1 g/g) for a dilution rate of 0.04 h<sup>-1</sup>.

C/N ratios from 40:1 to 60:1 are the most cited in literature for being the ratios which promote lipid accumulation (Shen et al., 2013, Beopoulos et al., 2009b, Nigam, 2000). The optimization of the process involves determining the optimal C/N ratio in addition to the optimal dilution rate in continuous culture.

### **3.2.6.3. Fed-batch operation**

The fed-batch operation is characterized by intermittent or continuous feedings of nutrients. This mode allows a prolongation of a traditional batch and a more precise control of the concentration of the substrate or of any other nutrients studied. Consequently, a fed-batch operation is usually used to overcome catabolite repression or substrate inhibition by sequential feedings of the substrate. This feeding improves the productivity of the fermentation by regulating the environmental variables to maximize the stability of the metabolic state. Nitrogen and carbon flow monitoring allows controlling the specific growth rate and the rC/rN ratio (Beopoulos et al., 2009b). Lipid production is generally performed in two main phases. The first phase promotes growth, where all nutrients are present in excess. The C/N flux ratio is equal to the catalytic biomass production requirements. Once the nutrients limitation occurs (generally nitrogen limitation), the C/N ratio is then controlled to promote lipid accumulation.

Among the numerous studies dealing with the fed-batch mode, Li et al. (2007) led a high density culture of *R. toruloides* grown in a fed-batch bioreactor. The final biomass concentration reaches 106.5 g/L, the lipid content 67.5% with a lipid productivity of 0.54 g/L/h. Fontanille et al. (2012) reported a biomass concentration of 30.83 g/L and a lipid content of 40.69% through fed-batch cultivation of *Y. lipolytica*. The cultivation of *C. curvatus* on glucose allows to obtain biomass concentration, lipid content and lipid productivity of respectively 104.1 g/L, 82.7% and 0.47 g/L/h. However a precise control of the substrate input should be respected in order to avoid a carbon limitation and the reserve lipids consumption which leads to a decrease of the cellular lipid concentration (Zhang et al., 2011).

### **3.2.7. Extraction, quantification and identification of lipids**

#### **3.2.7.1. Extraction methods**

One of the most important parameters for lipid production is the lipid content of the biomass. This piece of information allows the operator to control, to validate and to optimize the lipid production

processes. As a consequence, the extraction method and the lipid quantification must be fast and efficient. This method should also be applicable to an industrial scale-up. Several extraction methods have been referenced in literature. Among these methods, the Soxhlet method (1879) is the oldest. This method allows extraction using solvents and consists of a glass apparatus designed for solid/liquid extraction. It allows continuous lipid extraction by cycling washes of the sample by the solvent. More recently, the Folch method (Folch et al., 1957) allowed the extraction of lipids contained in animal tissues. Despite its fastness and its easiness to operate, this method is not completely adapted for the extraction of lipids contained into micro-organisms. Since then, the Folch method has been modified, making it more efficient for microbial lipids extraction but also longer (Cot et al., 2007). However, these modifications, consisting in a pretreatment step of lyophilisation and several washing cycles of 24 hours, take more than one week.

A well-known method from 1959 is the Bligh and Dyer method (Bligh and Dyer, 1959) which is also a derived version of the Folch method. This method has the advantage of reducing the solvent volume used and warrants recovery of more than 95 % of lipid. This method is, originally, meant for lipid extraction from fish tissues. It employs classical organic solvents such as chloroform and methanol. This method is the starting point of a new extraction system used by Cescut et al. (2011). The pressurized liquid extraction system consists of a controlled device meant for compounds extraction. Parameters of pressure, temperature, volume of extraction solvent and extracting time are tightly regulated. Lyophilized samples are automatically treated with a modified version of the Bligh and Dyer method.

Some studies focused on the use of green solvents in lipids extraction. Among the alternative solvents, terpenes such as alpha-pinene, limonene and cymene are used for lipid extraction of microalgae (Dejoye Tanzi et al., 2013). Emergent methods using supercritical fluids show that CO<sub>2</sub> can be used as an extraction solvent for lipid recovery and allows the recovery of 38,73% of lipids from *Mortierella alpina* (Nisha et al., 2012). Organic salts, associated with an ultrasonication step, have also been used for recovering microalgal lipids. Ionic liquids have also been tested due to their different solubilities and their high dissolving power for algal biomass. They are also classified as a green solvent (Kim et al., 2012).

If many pieces of research focus on lipids extraction methods, studies of biomass pretreatment are also on the go. Lipid reserves from oleaginous microorganisms are usually stored inside the cell as lipid globules. The presence of a cell wall makes their extraction difficult and slows down the solvents entry. Classically, the most employed pretreatment is the drying of the samples, by oven-drying or freeze-drying (Cescut et al., 2011; Dejoye Tanzi et al., 2013). However this pretreatment is not



applicable to an industrial scale-up, due to its cost and its duration. Other techniques consist in a cell disruption, using mechanical or non-mechanical methods. Mechanical methods are ultrasonication, high pressure homogenization, French pressing and bead milling. Non mechanical methods include chemical lysis (using acids or enzymes), osmotic shocks (Nisha et al., 2012) and microwave irradiation. Lee and al. (2010) analysed the effect of different pretreatments of microalgae biomass such as an autoclaving at 125°C, a bead beating, a microwave irradiation, a sonication, an osmotic shock using a 10% NaCl solution (Lee et al., 2010). A better efficiency of a microwave irradiation pretreatment (28.6 % of lipid content obtained) is demonstrated.

### 3.2.7.2. Lipid quantification

#### 3.2.7.2.1. Gravimetric assay

In the gravimetric method, after being dried, the total lipids are weighed and lipid content is calculated with respect to the dry weight of the extracted sample. In order to have an accurate precision, this type of methods generally requires high weight samples, i.e. more than 1 g dry weight, which is unusual with microbial cultures on a laboratory scale and therefore requires great culture volumes.

#### 3.2.7.2.2. Triphenyltetrazolium chloride assay (TTC)

Reduction of TTC into red coloured triphenylformazan (TF) is the basis of this method for the screening of fatty acids producing strains but can also be used to quantify lipids. Usually, TTC is used to test the viability of cells. This compound is taken up by the living cells and reduced by cellular dehydrogenases. This reduction reaction is enhanced by the addition of phenazin methosulfate (PMS) which competes with the flavoprotein of respiratory electron transport. This method was employed by Zhu et al. (2004) to detect arachidonic acid production in *M. alpina*. The hyphae of *M. alpina* become red coloured due to the activity of  $\Delta 5$  fatty acid dehydrogenase-desaturase while hyphae of non-lipid producing strains remain uncoloured (Zhu et al., 2004).

#### 3.2.7.2.3. Nile Red photofluorescent assay

Neutral lipids are assayed in moulds, yeasts and microalgae extracts by Nile Red coloration (Chen et al., 2009; Huang et al., 2009; Liu et al., 2008). This method is considered as a sensitive and quantitative method and may also be used for the screening of oleaginous strains. In this method, lipid extracts are suspended in a  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$  buffer of pH 7 and a solution of Nile Red in acetone (0.26  $\mu\text{M}$  Nile Red as the final concentration) is added to it. The microbial extracts are excited at 488 nm and reemission is measured at 570 nm before and after the addition of Nile Red. Reemission spectra are recorded between 500 and 700 nm. Lipid concentration may be correlated with the difference between the emission intensity at 570 nm. Lee et al. (1998) modified this method to assay

the lipids produced by *Botryococcus braunii* without involving extraction. After the addition of Nile Red, the cells were excited at 490 nm and the reemission measured at 585 nm. The difference between the peak intensities with and without Nile Red was found proportional to the lipid concentration (Lee et al., 1998).

Another lipophilic bright green fluorescent dye, BODIPY (boron-dipyrromethene), is presented as an alternative for Nile Red (Govender et al., 2012). Indeed, it has specificity for intracellular lipid bodies, a high oil/water partition coefficient, allowing to cross the cell membranes efficiently.

#### 3.2.7.2.4. Vanillin assay

Under acidic conditions, lipids make a coloured complex with vanillin. Lipids extracts are heated in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 100 °C followed by addition of 20 volumes of vanillin reactive (3 g vanillin, 0.5 L deionised H<sub>2</sub>O and 2 L phosphoric acid). After 30 minutes of incubation at room temperature, the absorbance of the mixture is recorded at 525 or 528 nm. A standard curve is prepared using olive oil at 525 nm (Yuehan Lu, 2008) or cholesterol at 528 nm (Gessner and Neumann, 2005) which is used for extrapolating the concentration of lipids.

#### 3.2.7.3. Fatty acids identification methods

Many methods to determine the fatty acid profile which is decisive for future use such as biofuel or for the production of a specific fatty acid exist in the literature. Lipids are generally transesterified before analysis, even on crude samples. Gas chromatography remains the principal method used for separation and identification of esterified fatty acids (Wynn and Ratledge, 1997). Detectors such as mass spectrometry (MS), infra-red spectrophotometry (IR) (Peng and Chen, 2008) or nuclear magnetic resonance (NMR) (ter Horst et al., 2009) have also been used for the identification of lipids. All these methods allow relative quantification of different fatty acids. Table I-8 presents the main techniques found in the literature.

**Tableau I-8. Lipid identification methods.**

References	Lipid fractionation	Transesterification on sample	Transesterification on extracted lipids	Identification methods
(Gill et al., 1977)	+	-	+	GC
(Kendrick and Ratledge, 1992)	+	-	+	GC
(Shimada et al., 1998)	-	-	+	GC
(Certik and Shimizu, 1999)	-	-	+	GC
(Stredansky et al., 2000)	-	-	+	GC
(Kavadia et al., 2001)	+	-	+	GCMS
(Papanikolaou et al., 2004)	+	-	+	GC-GCMS
(Peng and Chen, 2008)	+	-	+	GC-IR
(El Menyawi et al., 2000)	-	+	-	GCMS
(Zhu et al., 2002)	-	+	-	GC
(Li et al., 2007)	-	+	-	GC
(Xue et al., 2008)	-	+	-	
(Angerbauer et al., 2008)	-	+	-	GC

### 3.2.8. Single-cell oil as future biodiesel?

Commercial production of lipids is slowed down by the high cost of the substrates employed. Although glucose is an efficient carbon source for biomass production and lipid accumulation, its high price might interfere with the development of the third-generation biofuels. It has been shown that the raw materials cost represent roughly 88 % of the total estimated biodiesel production cost (Haas et al., 2006). Since carbon sources constitute over 60 % of the total production cost in typical fermentation processes, low-cost carbon sources should therefore be considered. Moreover, the strains should also be able to use these substrates and produce lipids from them.

Various low-cost substrates have already been evaluated: molasses, raw materials from the food industry (Huang et al., 2013; Ryu et al., 2013; Zhan et al., 2013); wastewaters (Muniraj et al., 2013; Peng et al., 2013), crude glycerol; whey (Ykema et al., 1988) and they turn out to be appropriate substrates for lipid production. The use of these cheap carbon sources will contribute to lower the final cost of biodiesel. Fei et al. (2011) show the cost of volatile fatty acids produced from anaerobic-digested foodwaste at around \$30/ton whereas glucose reaches \$500/ton (Fei et al., 2011b). So

although low-cost substrates are not favoured for biomass production and lipid accumulation, they could constitute an economically potential source for lipid and high-value biodiesel production.

An interesting way to reduce biodiesel cost is to add value to the by-products of the process, in particular biomass and crude glycerol, in a biorefinery concept. The residual biomass from biodiesel production can be potentially re-used as animal food as well as for methane production by anaerobic digestion. The waste glycerol produced during the transesterification reaction can also be used as a substrate for lipid production. Kiran et al. (2013) report a production of 40.9% of lipid by *R. toruloides* grown on crude glycerol. Unrefined glycerol is also one of the constituents of many chemical products such as 1,2-propanediol, 1,3-propanediol, polyesters, among others (Fan et al., 2010). The production of hydrogen from unrefined glycerol is another interesting application. Crude glycerol has been tested for the production of syngas, after an air-blown gasification step (Yoon et al., 2010). The final syngas composition was about 24%, 19%, 6% and 6% for H<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> respectively.

Although the production of biodiesel from yeast or fungi is still at laboratory level, this technology represents an interesting alternative for the production of biofuels in the future. The variety of existing microorganisms, the possibility of using low cost substrates and of recycling by-products of the reaction along with a good knowledge of the process are important arguments for the development of single-cell oils production as a renewable energy source.

### **3.3. Microbial production of omega-3 and omega-6**

#### **3.3.1. An original way to produce PUFAs**

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are vital important structural elements of cell membranes. They particularly confer fluidity, flexibility and selective permeability to membranes, and, therefore their administration is essential to ensure the development of organisms (Chang et al., 2009). Among the existing PUFAs, the omega-3 and omega-6 families have benefited from a growing attention due to their impact on human health. The omega-3 family (also referred to as  $\omega$ -3 or *n*-3) includes  $\alpha$ -linolenic acid (ALA or all-*cis*-9,12,15-octadecatrienoic acid or C18:3*n*-3), eicosapentaenoic acid (EPA or all-*cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid or C20:5*n*-3) and docosahexaenoic acid (DHA or all-*cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid or C22:6*n*-3), while the omega-6 family ( $\omega$ -6 or *n*-6) gathers  $\gamma$ -linolenic acid (GLA or all-*cis*-6,9,12-octadecatrienoic acid or C18:3*n*-6), linoleic acid (LA), arachidonic acid (ARA or all-*cis*-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid or C20:4*n*-6) and conjugated linolenic acid (CLA). ALA and LA are, for each family, the precursors of the other family members. They are qualified as “essential” because humans, and in general mammals, cannot synthesize these acids due to their lack of specific desaturase enzymes. Consequently, they need to find these acids through their diet.

### **3.3.2. Omega-3 fatty acids**

The omega-3 fatty acids family is defined by a double bond beginning at the third carbon from the methyl end. Mammals cannot insert double bonds more proximal to the methyl end than the ninth carbon atom. As a consequence, omega-3 fatty acids cannot be synthesized *de novo*. They must be present in the diet. ALA is the simplest member of the omega-3 series. It can be found in vegetable oils such as flaxseed oil and camelina oil and also in fish oils. ALA is the essential precursor of all longer-chained fatty acids because it is the metabolic precursor from which longer chain *n*-3 fatty acids are synthesized through a series of elongation and desaturation reactions.

EPA and DHA are the PUFAs derived from ALA. Their actions against cardiovascular diseases have been proven as they reduce arterial LDL-cholesterol delivery (Chang et al., 2009; Sudheendran et al., 2010), participate in the inflammatory response through resolvins and neuroprotectins generation (Kohli and Levy, 2009; Sudheendran et al., 2010) and suppress vascular smooth muscle cell proliferation (Sudheendran et al., 2010; Terano et al., 1999). Patients awaiting carotid endarterectomy who were given fish oil capsules enriched in  $\omega$ -3 showed a more stable morphology of their carotid plaques and a decreased macrophage infiltration (Thies et al., 2003). DHA is also a major structural component of the gray matter of the brain and the eye retina. Therefore DHA is essential to ensure optimum neural and visual functions (Birch et al., 2007). However, using fish oils as nutritional supplements, and notably for infants, is debatable because of the presence of environmental pollutants such as dioxins, heavy metals and PCB which might be absorbed by fish and concentrated in their livers and other organs.

The other important source of DHA is mother's milk. Also rich in ARA, mother's milk brings the indispensable fatty acids for neural development and visual acuity to new-borns. DHA and ARA are absent from cow's milk used in place of mother's milk. Therefore, they should be added to the diet of babies to ensure a normal development.

### **3.3.3. Omega-6 fatty acids**

*N*-6 fatty acids present a double bond starting at the sixth carbon from the methyl end. LA acts as a precursor for the synthesis of more highly unsaturated and longer-chained omega-6 family. LA is present in every food we eat. It is the predominant PUFA in dairy, vegetables, land-based meats, cereals, vegetable oils, nuts, seeds, fruits, legumes and breads (Whelan, 2008). GLA is produced in the body as a product of LA metabolism but can also be found in some plants oils such as evening primrose and borage oils. GLA has been incorporated into infant formula. It is also implied in treatments of several pathologies such as rheumatoid arthritis, atopic eczema, premenstrual tension and multiple sclerosis (Horrobin, 1992). Its conversion to ARA is catalyzed by the  $\Delta$ -5 desaturase

which is widely expressed in human tissues with the highest level in liver (Cho et al., 1999). The human organs, muscle, blood tissues and brain are particularly rich in ARA. This omega-6 fatty acid has a major role as a structural lipid associated predominantly with phospholipids. Together with DHA, ARA is of crucial importance for the brain development of children. ARA is a direct precursor of a number of eicosanoids regulating lipoprotein metabolism, blood rheology, leucocyte function and platelet activation. This PUFA is found in animal liver and egg yolks, but also in human breast milk. CLA refers to a group of PUFAs existing as positional and stereo-isomers of LA with a conjugated double bond. Many forms are possible (Sehat et al., 1998) but the major one naturally occurring is *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoic acid found in ruminant milks, dairy products and ruminant meats.

Currently, the omega-6 to omega-3 ratio brought by the Western diet reaches 15:1 to 16.7:1 (Simopoulos, 2006). Ideally, this ratio should be around 1:1. Over-consumption of omega-6 enhances pathogenesis of many diseases such as cardiovascular diseases, cancer, autoimmune and inflammatory diseases (Simopoulos, 2006). On the other hand, an enriched diet in omega-3 reduces the risk of heart disease (Ward and Singh, 2005). Many countries, as well as WHO, recommend a daily consumption of 0.8 to 1.1 g for ALA and 0.3 to 0.5 g for DHA+EPA. Daily dietary intake of ALA should vary from 0.5 to 2% of total dietary energetic input and omega-6 intake from 2.5 to 9%. ARA intake is not essential for healthy adults whose habitual dietary LA input represents 2.5% of total energetic input. For infants from 0 to 6 months, ARA intake should be supplied in the diet within the range of 0.2 to 0.3% based on human milk composition as a criterion (FAO, 2010).

### **3.3.4. An original and future way to produce PUFAs**

With the ongoing interest in PUFAs, the world wholesale market for infant formula has increased tremendously. PUFAs naturally brought by human milk have to be supplied in infant formulas in order to warrant a normal development of babies. Traditional sources of PUFAs are well-known (Table I-9), however, the search for cheaper, more accessible alternative sources of production began a few decades ago. Oleaginous organisms do not only produce C16 to C18 fatty acids, they also can manufacture longer chained fatty acids such as PUFAs. It is well established that some fungi such as *Mortierella isabellina* or *Mortierella alpina* and microalgae (*Cryptothecodinium cohnii*) are able to produce these high-value oils at levels of over 20% of the total fatty acids (Ratledge, 2004). Therefore, using these oleaginous microorganisms represents a promising way to produce PUFAs.

Currently, a growing number of companies works on research, development, manufacturing and selling of SCO-PUFAs or PUFAs containing products: DSM (ex-Martek Bioscience Inc.), Nestle S.A., Nutricia, to name but a few. However, before being offered for sale on the market, the product has to overcome tests ensuring its safety. The Food and Drug Administration (FDA) in particular has

developed a program called the “Generally Recognized as Safe” (GRAS) Notification Program. This program stipulates that “any substance that is intentionally added to food is a food additive and is subject to premarket review and approval by FDA, unless the substance is generally recognized, among qualified experts, as having been adequately shown to be safe under the conditions of its intended use, or unless the use of the substance is otherwise excluded from the definition of a food additive” (FDA). In 2001, Martek Bioscience Inc. obtained by the FDA the GRAS status for its ARA fungal oil (ARASCO) and DHA algal oil (DHASCO) infant formula ingredients.

**Tableau I-9. Dietary sources of functional lipids.**

Family	PUFA	Dietary sources
Omega-3	ALA	Vegetable oil (flaxseed oil, chia seed oil, canola oil, egg, meat, walnut, hazelnut), Fatty fish oil
	EPA	Fatty fish oil
	DHA	Fatty fish oil, Breast milk
Omega-6	LA	Vegetable oil, Nuts
	GLA	Evening primrose oil, Borage oil
	ARA	Egg yolk, Animal fat, Breast milk

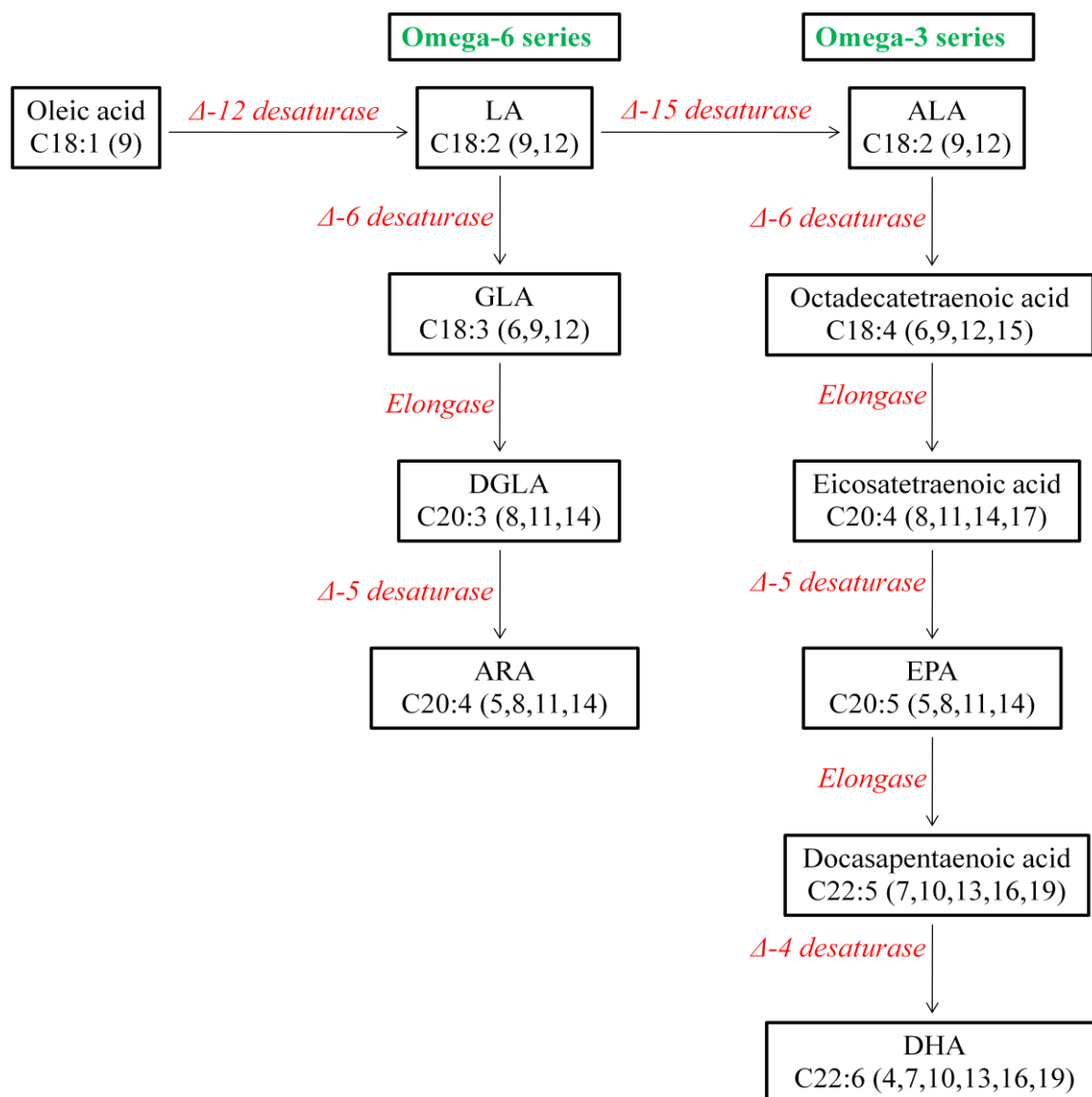
### **3.3.5. Biosynthesis of PUFAs**

#### **3.3.5.1. Elongation/desaturation pathway**

Understanding the metabolic pathway implied in the biosynthesis of PUFAs and how microorganisms are able to accumulate lipids of interest is of crucial importance in order to achieve the highest yield and productivity possible. Two distinct schemes for the production of PUFAs have been identified: the elongation/desaturation pathway which involves elongase and desaturase and the anaerobic polyketide pathway which occurs mainly in thraustochytrids and are large-celled marine heterokonts.

In eukaryotic and prokaryotic cells, lipogenesis leads to the final production of palmitic acid from malonyl- and acetyl-CoA. The fatty acid synthase is the complex of enzymes implied in this process. The palmitic acid obtained is modified by series of desaturation and elongation to produce longer-chained fatty acids. In oleaginous yeasts, the type of fatty acids is limited: the most frequently found are oleic, linoleic, palmitic and palmitoleic acids. PUFAs appear at levels of over 20% of the total fatty acids only in fungi and microalgae (Ratledge, 2004). The succession of reactions leading to PUFAs are realised by desaturase enzyme which inserts double bonds at specific carbon atoms in the fatty acid chain while the elongase enzyme adds two-carbon increments to the molecules. In fungal producers of PUFAs, stearic acid is desaturated by  $\Delta$ -9 desaturase. The forming of oleic acid is followed by a desaturation step, catalyzed by  $\Delta$ -12 desaturase and leading to the production of LA (Figure I-8). LA is the substrate of a second desaturation step which implies  $\Delta$ -15 desaturase and ensures the

production of ALA. Then, a series of reactions described in Figure 3 leads to the formation of others PUFAs.



**Figure I-8. Route of polyunsaturated fatty acids biosynthesis.**

Oleic acid is desaturated by the  $\Delta$ -12 desaturase and leading to the production of LA. LA is the substrate of a second desaturation step implying the  $\Delta$ -15 desaturase which ensures the production of ALA. From ALA, the  $\Delta$ -6 desaturase inserts a double bond to produce the C18:4(6,9,12,15) intermediate which is elongated to form C20:4(8,11,14,17) molecule. A second desaturation mediated by the  $\Delta$ -5 desaturase leads to the synthesis of EPA (C20:5) which is at last elongated and desaturated by the  $\Delta$ -4 desaturase, allowing the final production of DHA (C22:6). LA is the precursor of the omega-6 series. First LA is desaturated by the  $\Delta$ -6 desaturase for the production of GLA (C18:3). GLA is then elongated and desaturated by the  $\Delta$ -5 desaturase to form ARA (C20:4). ARA can be elongated as well and submitted to a desaturation step mediated by the  $\Delta$ -4 desaturase to produce docosapentaenoic acid (DPA, C22:5).



It should be noticed that  $\Delta$ -5 and  $\Delta$ -6 desaturases can potentially operate in either the n-3 or the n-6 fatty acid pathway, converting either DGLA to ARA or 20:4n-3 intermediate to EPA. They belong to a subgroup of desaturases that have been designated the “front-end” desaturases. The front-end desaturases have similar sequence homology and share distinct features that separate them from the desaturases that insert double bonds to the methyl end of the fatty acid relative to the initial  $\Delta$ -9 desaturation (Ratledge and Wynn, 2002).

In mammals,  $\Delta$ -12 and  $\Delta$ -15 desaturases are lacking. Therefore, ALA and LA cannot be produced by humans and they require these EFAs in their diet (Wallis et al., 2002).

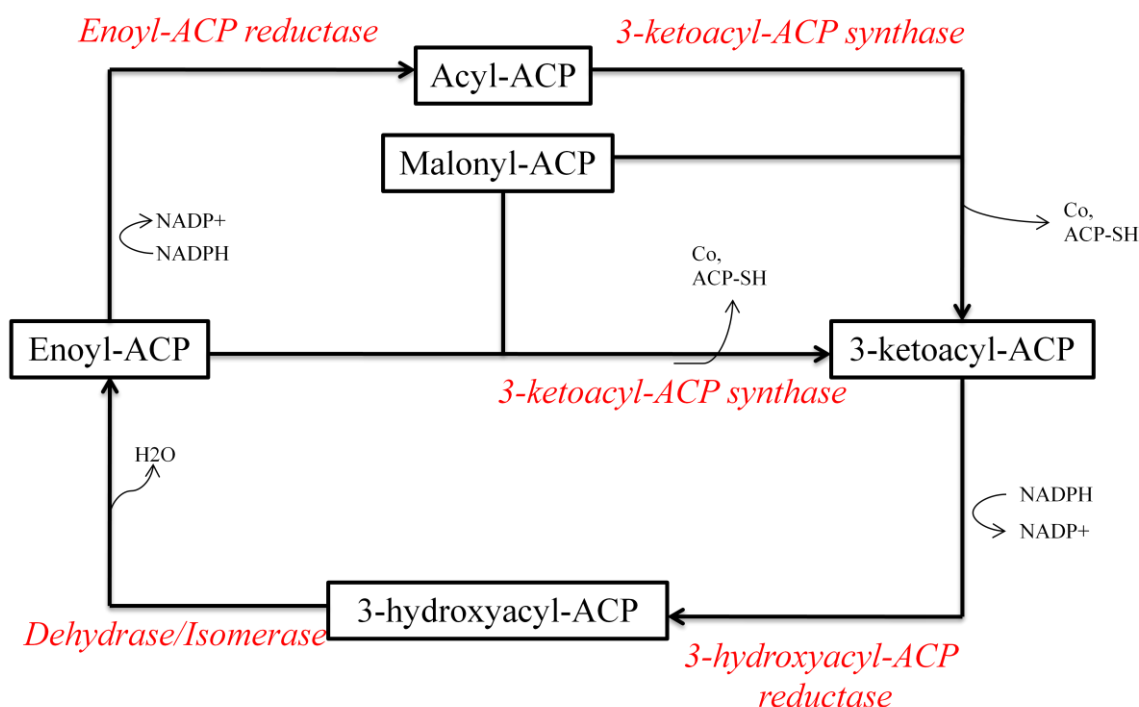
#### 3.3.5.2. Anaerobic polyketide synthase pathway

Recently, an alternative pathway for DHA biosynthesis has been discovered in *Schizochytrium*, a genus of unicellular micro-organisms found in coastal marine habitats belonging to the family of Thraustochytriaceae (Metz et al., 2009, 2001). The characteristic of this new pathway is that double bonds are introduced in the acyl chain during fatty acid biosynthesis, without the requirement of aerobic desaturation. Thus it is also called the anaerobic pathway for DHA synthesis. The term “anaerobic” emphasizes that oxygen is not implied in the synthesis of double bonds. In bacteria and fungi, the PKS pathway is implied in the synthesis of a large collection of antibiotics. This pathway has been discovered in particular in marine bacteria such as *Shewanella* and *Moritella marina*, known to produce EPA and DHA, respectively.

The polyketide synthase (PKS) is an enzymatic complex similar to the fatty acid synthase found in bacteria. It uses an acyl carrier protein as a covalent attachment for chain synthesis, proceeding with reiterative cycles (Figure I-9). An acyl-ACP and a malonyl-ACP first condense thanks to the 3-ketoacyl-ACP synthase to form 3-ketoacyl-ACP. The latter is reduced by a 3-hydroxyacyl-ACP reductase and the reaction produces 3-hydroxyacyl-ACP. A dehydrase/isomerase removes a water molecule and induces the production of enoyl-ACP. Finally, enoyl-ACP is reduced to form a saturated acyl-chain (Qiu, 2003). However, contrary to fatty acids synthesis, some steps such as dehydration and reduction do not occur during the polyketide synthesis.

The exact mechanism underlying DHA synthesis with this new pathway remains to be defined but the key features likely include condensation and isomerisation steps. Ketosynthase is known as the key enzyme of this pathway. This enzyme can catalyze the condensation of a wide range of substrates, including unsaturated fatty acids. Enoyl-ACP with malonyl-ACP can be condensed by ketosynthase, leading to the production of a fatty acid with double bonds. The isomerase enzyme is also of crucial

importance for DHA synthesis. This enzyme, occurring either with dehydratase or separately, would warrant precise location and stereospecific configuration of double bonds in the PUFAs (Qiu, 2003).



**Figure I-9. The anaerobic polyketide synthase pathway for DHA biosynthesis (Ghasemnezhad and Honermeier, 2008).**

The PKS system uses acyl carrier protein as a covalent attachment for chain synthesis. An acyl-ACP and a malonyl-ACP first condense thanks to the 3-ketoacyl-ACP synthase to form 3-ketoacyl-ACP. The latter is reduced by a 3-hydroxyacyl-ACP reductase and the reaction produces 3-hydroxyacyl-ACP. A dehydrase/isomerase removes a water molecule and induces the production of enoyl-ACP. Finally, enoyl-ACP is reduced to form a saturated acyl-chain.

### 3.3.6. Omega-3 and omega-6 produced by micro-organisms

#### 3.3.6.1. Microbial production of GLA

One of the most important and traditional sources of GLA is the evening primrose. Its seed in particular can store lipids up to 20-30% of its dry weight and 7-10% GLA (Ghasemnezhad and Honermeier, 2008). The impact of GLA on human health has been previously described. According to Life Sciences Alliance, up to 2000 tons of GLA, mostly from China, are produced per year at a bulk price of around \$15 per kilogram. The expensive price is due to high fluctuations in availability and the high costs of production and purification.

Among alternative sources of production, Mucorales, including *Mortierella* and *Mucor* genus, are well-known for their tendency to produce GLA. It is worth noticing that already in 1985, *Mucor (javanicus) circinelloides* had been selected for its ability to produce high amount of GLA (18-22%)

over twice that of evening primrose oil. The fungus has been cultivated in large-scale fermenters (220 m<sup>3</sup>) by J. & E. Sturge Ltd. (England), allowing a GLA content of 20-25% produced in 72-96 hours. The oil was sold under the name of Oil of Javanicus or it was mixed with evening primrose oil. However, the production stopped in 1990 when the company was sold to Rhone-Poulenc (Ratledge, 2002).

Since then, GLA production by fungi has not stopped and research is still in progress. Table I-10 references the work undertaken in this field. Strains such as *Mortierella isabellina* and *Cunninghamella echinulata* represent promising ways for the development of microbial production of GLA.

### 3.3.6.2. Microbial production of DHA

Currently, two strains are commercially used for the production of DHA: *Cryptocodinium cohnii* and strains from the thraustochytrid marine protists (Table I-11). *C. cohnii* is a heterotrophic dinoflagellate which can produce DHA content of more than 50% of its total fatty acids produced (Jiang et al., 1999). This dinoflagellate has been chosen by Kyle to produce DHA used in DHASCO, a commercial mixture of DHA (40-45%) and high oleic sunflower oil incorporated in infant formulae and other foods (Kyle, 1994). The process is done in the United States and is exploited by Martek Biosciences Corporation (now acquired by DSM). It uses stirred tank fermenters with glucose as the principal feedstock. In 1999, De Swaaf et al. developed a high density fed-batch culture system for *C. cohnii* grown on ethanol and reported a final biomass concentration of 83 g/L, lipid concentration of 35 g/L and DHA concentration of 11.7 g/L in a 220 hours fermentation (de Swaaf et al., 1999). In 2003, De Swaaf et al. tested a fed-batch culture of *C. cohnii* using glucose as initial substrate and acetic acid as feeding medium and this system allows a final biomass concentration of 109 g/L, lipid concentration of 61 g/L and DHA concentration of 19 g/L in a 400-hour fermentation. The authors reported these results as being the highest biomass, lipid and DHA yields reported in heterotrophic dinoflagellate (de Swaaf et al., 2003).

Thraustochytrids form a group of common marine microheterotrophs, originally classified as marine fungi and now taxonomically aligned with heterokont algae (Dick, 2001). *Thraustochytrium sp.* and *Schizochytrium sp.* are the main organisms investigated for DHA production (Table I-11). Thanks to their efficiency to produce DHA, thraustochytrids participate actively in the transfer of this omega-3 into marine ecosystem and consequently to land (Gladyshev et al., 2013). Currently, DSM commercialises life'sDHA which is a nutraceutical containing DHA produced by *Schizochytrium sp.* or *C. cohnii*.

### 3.3.6.3. Microbial production of EPA

Fungi belonging to Mucorales produce significant quantity of EPA (Table I-12). Usually this fatty acid occurs in lower quantities than the other fatty acids produced in fungi. Thraustochytrids have been envisaged as a novel source of production of EPA, together with DHA (Gupta et al., 2012). Algae are also potential candidate for an industrial production of EPA. The dietary supplement, life'sOMEGA produced by DSM, containing a mixture of EPA and DHA has an algal origin.

### 3.3.6.4. Microbial production of ARA

ARA was the second PUFA produced by microorganisms to be developed after GLA production. Work on ARA production by oleaginous organisms is presented on Table I-13. Genus *Mortierella* is the most important producer of ARA representing up to 50% of the total fatty acids produced in wild strains. *Mortierella alpina* is the fungi currently used for the production of dietary supplements enriched in ARA commercialised by DSM. Takeno et al. (2005) used transformants of *M. alpina* which showed higher percentages of ARA content compared to the wild strain. The transformant *M. alpina* pDZeGLELO 63 presented an ARA content of over 70% of the total fatty acids, whereas wild *M. alpina* produced an ARA content of ca. 50%. More and more studies focus on mutants of fungi of interest to improve their ability to produce PUFAs (Sakuradani et al., 2013; Takeno et al., 2005). However, if metabolic engineering can lead to better results concerning the production of PUFAs, it is unsure that oils coming from genetically modified organisms will be accepted by the population, especially if it concerns infant formula and health.

**Tableau I-10. Strains involved in GLA microbial production. TFA = Total Fatty Acids.**

Strains	Ref.	GLA	Substrate	Culture conditions	
		% TFA		Culture mode	Experimental conditions
<i>Mortierella ramanniana</i>	(Dyal et al., 2005)	13.3 <sup>a</sup>	Dextrose + yeast extract	Flask	Supplementation of 5 mg/L Mn <sup>2+</sup>
<i>Cunninghamella echinulata</i>	(Chen and Liu, 1997)	11.2 - 13.4 <sup>a</sup>	Soluble starch	Flask	
<i>Mucor circinelloides</i>	(Čertík et al., 2013)	0.8-2 <sup>b</sup>	Cereal substrates	Solid state fermentation	
<i>Mortierella isabellina</i>	(Demir et al., 2013)	5.48	Deproteinized whey + 16% lactose	Flask	
		20.29	CMC	Flask	
<i>Mortierella isabellina</i>	(Zeng et al., 2013)	3.74	Xylose	Flask	Presence of vanillin
		4.78	Xylose	Flask	Presence of levulinic acid
<i>Mortierella isabellina</i>	(Xing et al., 2012)	3.85	Corn fiber hydrolysates	Flask	
		16.7	Xylose	Flask	C/N 78
		16.6	Xylose	Flask	C/N 117
		21	Xylose	Flask	C/N 157
		19.5	Xylose	Flask	C/N 235
<i>Cunninghamella echinulata</i>		22	Xylose	Flask	C/N 285
		18	Raw glycerol	Flask	C/N 78
		10	Raw glycerol	Flask	C/N 117
	(Fakas et al., 2009)	13	Raw glycerol	Flask	C/N 157
		16.2	Raw glycerol	Flask	C/N 235
		15.5	Raw glycerol	Flask	C/N 285
		8.7	Raw glycerol	Flask	C/N 78
		11.6	Raw glycerol	Flask	C/N 117
<i>Mortierella isabellina</i>		12.8	Raw glycerol	Flask	C/N 157
		5.2	Raw glycerol	Flask	C/N 235
		9.7	Raw glycerol	Flask	C/N 285

<sup>a</sup> % wt.; <sup>b</sup> Yield (mg/g)

**Tableau I-11. Strains involved in DHA microbial production. TFA = Total Fatty Acids.**

Strains	Reference	DHA		Substrate	Culture conditions	
		% wt.	% TFA		Culture mode	Experimental conditions
Thraustochytrids	(Bowles et al., 1999)		28	Glucose + yeast extract	Bioreactor	
<i>Thraustochytrium aureum</i>	(Iida et al., 1996)		40	Glucose	Flask	Medium supplemented with glutamate
<i>Schizochytrium sp.</i>	(Wu et al., 2005)	5.23	13.22	Glucose	Flask	pH 7
		4.79	14.24	Fructose	Flask	
		5.57	16.08	Glucose	Flask	pH 7 + yeast extract 0.4 %
<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	(Huang et al., 2012)		49.5-55.2			C/N 0.5
			51.4-58.2	Glycerol	Fed-batch culture in bioreactor (10L)	C/N 1.25
			57.3-66.6	Glycerol		C/N 1.875
			21.36	Glycerol	Flask	
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	(Jiang et al., 1999)		51.12	Glucose	Flask	
<i>Schizochytrium mangrovei</i>	(Unagul et al., 2007)		ca. 40	Glucose	Flask	Medium supplemented with coconut water

**Tableau I-12. Strains involved in EPA microbial production. TFA = Total Fatty Acids.**

Strains	Reference	EPA		Culture conditions		
		% TFA	Yield mg/g	Substrate	Culture mode	Experimental conditions
<i>Mortierella elongata</i>	(Cheng et al., 1999)	13		Soybean oil 3%	Flask	
<i>Pythium irregulare</i>		4.6		Soybean oil 3%	Flask	
<i>Pythium ultimum</i>	(Stredansky et al., 2000)	4.4	1.8	Coconut oil + spent malt grains	Solid-state cultivation	
		5.6	2.7	Peanut oil + spent malt grains	Solid-state cultivation	
		5.5	2.6	Sunflower oil + spent malt grains	Solid-state cultivation	
		8.2	3.4	Linseed oil + spent malt grains	Solid-state cultivation	
<i>Pythium irregulare</i>	(Liang et al., 2012)		9.70 ± 1.73	Thin stillage	Flask	
			7.93 ± 2.40	Glycerol + thin stillage	Flask	
			8.40 ± 1.36	Glycerol + yeast extract	Flask	
			9.65 ± 1.24	Glucose + yeast extract	Flask	
<i>Mortierella alpina</i>	(Jang and Yang, 2008)	16.9 ± 0.7		Rice bran	Solid-state fermentation	Nitrogen supplementation

**Tableau I-13. Strains involved in ARA microbial production. TFA = Total Fatty Acids.**

Strains	Reference	ARA		Yield mg/g	Substrate	Culture conditions	
		% wt.	% TFA			Culture mode	Experimental conditions
<i>Mortierella alpina</i>	(Takeno et al., 2005)		53.4 ± 0.98		Glucose + yeast extract	Flask	Wild strain
			62.2 ± 1.12		Glucose + yeast extract		Transformant strain
			71.2 ± 1.34		Glucose + yeast extract		Transformant strain
<i>Mortierella alpina</i>	(Yu et al., 2003)	5.77 ± 0.42	15.29 ± 2.1		Glucose	Flask	Supplementation with glutamate
		5.02 ± 0.21	14.78 ± 0.97		Glucose	Fermenter 6L	Supplementation with glutamate
<i>Mortierella elongata</i>	(Cheng et al., 1999)		58		Soybean oil 3%	Flask	
<i>Pythium irregulare</i>			8.3		Soybean oil 3%		
<i>Pythium ultimum</i>	(Stredansky et al., 2000)		5.2	2.2	Coconut oil + spent malt grains	Solid-state cultivation	
			4.4	2.1	Peanut oil + spent malt grains		
			4.4	2.0	Sunflower oil + spent malt grains		
			6.1	2.5	Linseed oil + spent malt grains		



### **3.3.7. Processes for microbial PUFAs production**

#### **3.3.7.1. Submerged fermentation**

Submerged fermentation processes are similar to those presented in the **Cultivation modes for lipid accumulation** part. On a laboratory-scale, studies are mainly led in flasks with a batch process, as shown in Tables I-10 to I-13. Fungi are also cultivated in bioreactors, using a batch, fed-batch or continuous strategy. This scale-up improves final biomass and lipid concentrations, since parameters are more efficiently regulated. However, several barriers have been identified for the growth of fungi in bioreactors.

To achieve a bioconversion in a fermenter, mass and heat transfer, gas dispersion and mixing of the medium are required (Cui et al., 1997). In the case of fungal fermentation, the agitation fulfils the above functions but may also influence the morphology of fungi (Cui et al., 1997). The fungal organization is often considered as one of the key parameters in industrial production in large fermenters. Two forms exist: dispersed mycelia or pellets. It has a strong effect on the physical properties of the fermentation broth. The fungal morphology is also a determinant component in the production of lipids of interest because the lipid concentration depends on the morphology. It has been demonstrated (Higashiyama et al., 1998) that the morphology of *M. alpina* affects the productivity of ARA, with small pellets showing the highest productivity.

Microalgae are also producers of PUFAs of interest. Heterotrophic growth seems to be the preferential mode of culture among the others (mixotrophic, photoheterotrophic and phototrophic) which offers better oil productivity. However, heterotrophic culture can be contaminated very easily, particularly in open-culture systems. This risk of contamination hampers large-scale production. Phototrophic cultivation is mainly attractive due to the fact that CO<sub>2</sub> can be used as the sole carbon source and that no additional energy source is necessary besides light. The oil productivity of this approach is usually lower than that of heterotrophic cultivation. This is mainly due to slow cell growth and low biomass productivity. But phototrophic cultivation remains attractive (Chen et al., 2011).

#### **3.3.7.2. Solid-state fermentation**

Solid-state fermentation (SSF) requires solid matrix and is carried out in absence or near absence of free water. However, the substrate should be moist enough to support microbial growth and metabolism. The solid matrix could be either the source of nutrients or simply a support impregnated by the nutrients (Singhania et al., 2009). In general, SSF is simple in terms of equipment and process control and less expensive than submerged fermentation. The elimination of water and mineral salts

traditionally used for the constitution of a growth medium makes the process economically interesting. The substrates used in this fermentation mode are usually wastes from raw agromaterials or by-products from the food industry such as cereal, rice bran and spent malt grain (Čertík et al., 2013; Jang and Yang, 2008; Stredansky et al., 2000). The feedstock used can be valorized by this approach as they are enriched in PUFAs. As a result, the product obtained from this fermentation consists in a cereal-derived product with a high content of valuable metabolites, which may be envisaged as a feed supplement in the future. Certik et al. (2013) have demonstrated the efficiency of *M. circinelloides* to enrich cereal substrates naturally poor in PUFAs with GLA (24.2 g/kg solid substrate) and  $\beta$ -carotene. However, SSF remains actually well controlled in laboratory but is not yet used on an industrial scale for oil production.

### **3.3.8. Downstream processing of PUFAs**

#### **3.3.8.1. Recovery of oils in fungi**

The main typical processes for microbial lipids extraction have been described previously. However, resistance of the fungal wall becomes the rate limiting step for the recovery of fungal oils (Nisha et al., 2012). The fungal wall is an intricate structure composed of chitin, 1, 3- $\beta$ - and 1, 6- $\beta$ -glucan, mannan and proteins with a higher rigidity than that of plant cells. Consequently a pretreatment step has to be done before the extraction. Nisha et al. (2012) have reported a better lipid yield when samples undergo enzymatic or HCl pretreatment than when the extraction was realized directly on control samples.

The same authors also used supercritical fluid to prevent lipids from auto-oxidative degradation. Used to extract lipids of a culture of *M. alpina*, supercritical CO<sub>2</sub>, associated to an HCl pretreatment of the biomass, allows the recovery of 26.78% lipids and an ARA content of 33.28% (Nisha et al., 2012).

#### **3.3.8.2. Refining and modification of microbial oils**

The final processing of microbial oils involves purification or refining and modification steps. Contaminants of the crude oil, which may affect the quality of the final product, should be removed or reduced by refining treatments. Antioxydants such as tocotrienols or tocopherol, which are present in the crude oil, have a beneficial effect on product quality. They also ensure a protection against oxidation. Purification and concentration of microbial oils require the use of several processes depending on the extracted fatty acid and the operation scale (Certik and Shimizu, 1999).

**Tableau I-14. Summary of general PUFA enrichment processes (Ward and Singh, 2005).**

Method	Procedure
Winterization	Removal of saturated fats from oils by gentle cooling.
Triglyceride hydrolysis	Production of glycerol and free fatty acids using saponification or enzymes such as lipases
Urea complexation	Addition of urea and aqueous ethanol to the fatty acids mixture at high temperature. Formation of urea-saturated complexes by cooling down the mixture. Removal of complexes by filtration or centrifugation. Addition of hexane to the supernatant Recovery of PUFAs as free fatty acids from hexane by evaporation
Enzyme splitting	Selective esterification of saturated fatty acids by lipases Separation of PUFAs from the esterified saturated fatty acids fraction Repeat esterification for further PUFA enrichment
PUFA transformations	Esterification of PUFAs or interesterifications to enrich non-highly unsaturated fatty acids oils with PUFAs

A summary of the general PUFA enrichment processes is presented in Table I-14. Solvent winterization applied on *Borago officinalis* oil allows a GLA enrichment of nearly 90% when hexane was used and when the temperature was reduced to 70°C (López-Martínez et al., 2004). The efficiency of PUFA enrichment using solvent winterization is strongly temperature-dependant (Yokochi et al., 1990).

Urea inclusion is also an enrichment method mainly based on the degree of unsaturation of the fatty acids. Saturated and mono-unsaturated fatty acids easily form urea compounds to be removed from the urea concentrate. When used for an ARA enrichment from *M. alpina* lipids, this technique allows to obtain an ARA content in the urea concentrate of 57.1% and a final ARA recovery of 81.9% (Zhu et al., 2002).

Enzyme-based procedures are especially advantageous because enzymes such as lipases act under mild reaction conditions. Long chain PUFAs are very labile. Methods implying extreme pH or temperature conditions can destroy the all *cis* nature of omega-3 fatty acids (such as EPA or DHA), by *cis-trans* isomerization, oxidation or migration of double bonds (Ward and Singh, 2005).

Lipase enzymes could be used to enrich PUFAs in oils. It can also produce different forms and compositions of PUFAs such as triglycerides, phospholipids, other fatty acids esters and free fatty acids (Ward and Singh, 2005). The natural function of lipases is the hydrolysis of oils. Hydrolysis of triglycerides is an essential reaction for the production of fatty acids. Kahveci and Xu have reported

that a lipase-catalyzed hydrolysis can contribute to enrich salmon oil with omega-3 PUFAs to more than the double of the initial level (Kahveci and Xu, 2011).

### **3.3.9. Future outlook**

The production of PUFAs by microbial strains is an industrial reality. The infant formula market is now around \$11.5 billion and is still growing. The health benefits toward newborns, adults and elderly people brought by omega-3 and omega-6 are now widely known.

A better knowledge of the microbial capacities of production allows the synthesis of these important PUFAs on a large-scale level, provided by oleaginous organisms. Among them, fungi belonging to the Mucorales and thraustochytrids are efficient candidates to realize this production. *Mortierella alpina* in particular is widely used in large-scale production as it produces important quantities of different PUFAs with interesting growth rate and lipid productivity. There is also a growing interest toward the development of genetically modified organisms. Pieces of work focusing on recombinant strains which possess the ability to produce higher quantity of selective PUFA are increasing. The knowledge of metabolic pathways implied in the lipid production, together with the progress of molecular biology techniques allows to demonstrate the feasibility of this approach. However, as for transgenic plants, time, extensive investigations and testing procedures are necessary before the public opinion accepts this industrial mode of production.

Currently, the industrial production of PUFAs takes place using traditional fermenters and submerged fermentation. The development of solid-state fermentation which uses substrates such as agroindustrial and lignocellulosic waste could lead to the development of a new type of animal feed, as the final products could be enriched with PUFAs. The production of enriched-cereal with PUFAs can also be considered for the human diet.

The use of low-cost and renewable substrates should be considered in an ecological approach. Organic waste is perfectly suitable for the growth of microorganisms and studies have proved it can be bioconverted into PUFAs by particular microorganisms. In addition to be easily available, waste and byproducts contribute also to the decreasing of the final price of the product.

#### **4. UTILISATION DES ACIDES GRAS VOLATILS (AGVs) POUR LA PRODUCTION DE BIODIESEL**

Les teneurs en lipides obtenues au cours de cultures de levures oléagineuses sur substrat simple (glucose notamment) sont particulièrement satisfaisantes (Tableau I-6). Ces substrats carbonés présentent l'avantage d'être efficacement convertis en lipides microbiens. Cependant le coût final des lipides microbiens se retrouve impacté par celui de la source de carbone initial, notamment lorsque celui-ci est élevé. L'utilisation de sucres simples ne permet d'envisager une production de lipides et de biodiesel économiquement compétitive. Le recours à des substrats renouvelables et peu onéreux est donc nécessaire pour réduire les coûts de procédé. Parmi ces substrats renouvelables, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'emploi d'acides gras volatils (AGVs) comme sources potentielles de carbone pour la croissance et la production de lipides par des levures oléagineuses.

Les AGVs sont des acides gras à courte chaîne (de deux à six atomes de carbone), produits chimiquement à partir des énergies fossiles ou biologiquement par des procédés de fermentation. Ces molécules constituent un groupe de composés chimiques utilisables dans divers domaines d'application : les piles à combustible microbiennes (PCM) (Wang et al., 2012; Yang et al., 2015), la production d'hydrogène par photofermentation (Uyar et al., 2009), la dénitrification (Elefsiniotis and Wareham, 2007) ou encore la production de lipides par des levures oléagineuses (Chi et al., 2011; G. Christophe et al., 2012; Fontanille et al., 2012). Le coût de production des AGVs est relativement faible lorsqu'ils sont produits à partir de ressources alimentaires. Le prix à la tonne a été estimé à 30\$ en Corée, ce qui est 17 fois moins élevé que le coût du glucose seul (500\$/tonne) (Fei et al., 2011a).

Certaines levures ont la capacité à assimiler ces substrats carbonés pour leur croissance mais peuvent également, dans certaines conditions de culture, convertir ces composés en molécules à plus haute valeur ajoutée tels que les lipides. Plusieurs études se sont intéressées à la bioconversion de ces molécules par des levures oléagineuses et sont présentées dans le tableau I-15.

**Tableau I-15. Production de biomasse et de lipides par des levures oléagineuses utilisant des AGVs comme source de carbone.**

Souche	Substrat	Concentration biomasse (g/L)	Teneur en lipide max. (%)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{l/s}$ (g/g)	Référence
<i>C. curvatus</i>	Mannitol/AGVs	3,6	48,3			(Xu et al., 2014)
<i>C. curvatus</i>	AGVs	2,5	61	0,27	0,15	(Xu et al., 2015)
<i>C. curvatus</i>	Glucose/acétate	13	50,9	0,30	0,15	(Christophe et al., 2012)
<i>C. curvatus</i>	Acétate	68,8	53,8			(Chi et al., 2011)
<i>C. curvatus</i>	Acétate	2,8	37,2			(Zheng et al., 2012)
<i>C. albidus</i>	AGVs	0,96	14,9		0,03	(Vajpeyi and Chandran, 2015)
<i>C. albidus</i>	AGVs	2,6	25,1			(Fei et al., 2011a)
<i>C. albidus</i>	Acétate	2,9	25,8			(Fei et al., 2011a)
<i>Y. lipolytica</i>	Glucose/acétate	30,5	40,7	0,32	0,13	(Fontanille et al., 2012)

#### **4.1. *Cryptococcus curvatus***

*Cryptococcus curvatus*, anciennement nommée *Apiotrichum curvatum* et *Candida curvata* D, est une levure oléagineuse appartenant à la classe des Basidiomycètes. Cette levure, de forme ovoïde, se multiplie par bourgeonnement. Elle est aérobique et se développe préférentiellement à des températures comprises entre 25 et 35°C. Son pH optimal de croissance sur glucose est de 6.

*C. curvatus* se caractérise par sa capacité à accumuler des lipides pouvant représenter jusqu'à 60% de sa masse sèche, faisant d'elle l'une des levures oléagineuses les plus performantes pour la production de lipides. Cette levure est également capable de convertir une large gamme de sources de carbone en lipides. Cette gamme de substrats utilisables comprend les substrats simples tels que le glucose, le xylose, le maltose ou le glycérol (Hansson and Dostálek, 1986) mais également des substrats plus complexes tels que les déchets issus de l'industrie agro-alimentaire (bagasses de sorgho, déchets de l'industrie brassicole, lactosérum...) (Ryu et al., 2013; Seo et al., 2013; Ykema et al., 1988). Cette souche possède également la faculté de convertir les AGVs en lipides microbiens, comme l'attestent plusieurs travaux réalisés au sein de notre laboratoire de recherche mais également d'autres équipes de recherche (Chi et al., 2011; Christophe et al., 2012; Zheng et al.,

2012). Les teneurs en lipides atteintes par cette souche sont supérieures à 50% (tableau I-15), ce qui est similaire aux valeurs obtenues lorsque ces levures sont cultivées à l'aide de substrats simples.

Les lipides accumulés par cette levure forment des gouttelettes huileuses dans le cytoplasme, constituées de triglycérides. Les acides gras majoritairement représentés sont des acides gras en C16 et C18, en particulier les acides palmitique, palmitoléique, stéarique, oléique, linoléique, et dans une moindre mesure l'acide linoléique. Ce profil d'acides gras est proche de ceux présentés par les lipides produits par des plantes oléagineuses utilisées actuellement pour la production de biodiesel de première génération. Ces caractéristiques font de cette levure la candidate retenue pour notre étude pour sa capacité à utiliser les substrats complexes tels que les AGVs comme source de carbone et à les convertir en lipides.

## **4.2. Voies de production de lipides microbiens à partir d'AGVs**

La production de biomasse et de lipides par des microorganismes cultivés sur AGVs implique que ces molécules puissent entrer dans la cellule et être métabolisées afin de fournir les éléments nécessaires à la croissance et la production de métabolites. Les mécanismes d'entrée ainsi que les voies métaboliques empruntées par les AGVs et répertoriées dans la littérature font l'objet des volets suivants.

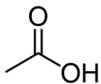
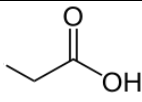
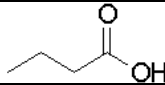
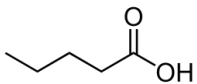
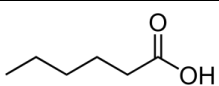
### ***4.2.1. Mécanismes d'entrée des AGVs dans la cellule***

#### ***4.2.1.1. Caractéristiques des principaux AGVs***

Les caractéristiques chimiques des AGVs majoritairement retrouvés dans les procédés fermentaires sont présentées dans le tableau I-16.

En solution aqueuse, les AGVs peuvent être présents sous deux formes, dissociée ou indissociée. Ce caractère est dépendant du pH du milieu et du  $pK_A$  de l'acide. La forme de cet acide est déterminante puisqu'elle va influencer le comportement de la levure, en particulier le mécanisme par lequel ces molécules vont pénétrer les membranes biologiques.

**Tableau I-16. Forme, pK<sub>A</sub> et poids moléculaires des AGVs.**

Nom	Formule développée	Base conjuguée	pK <sub>A</sub> à 25°C	Masse molaire (g/mol)
Acide acétique CH <sub>3</sub> COOH		Acétate CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	4,75	60,05 ± 0,0025
Acide propionique CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH		Propionate CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>	4,87	74,08 ± 0,0034
Acide butyrique CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH		Butyrate CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>	4,82	88,11 ± 0,0044
Acide valérique CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH		Valérate CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	4,84	102,13 ± 0,0053
Acide caproïque CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH		Caproate CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COO <sup>-</sup>	4,88	116,16 ± 0,0062

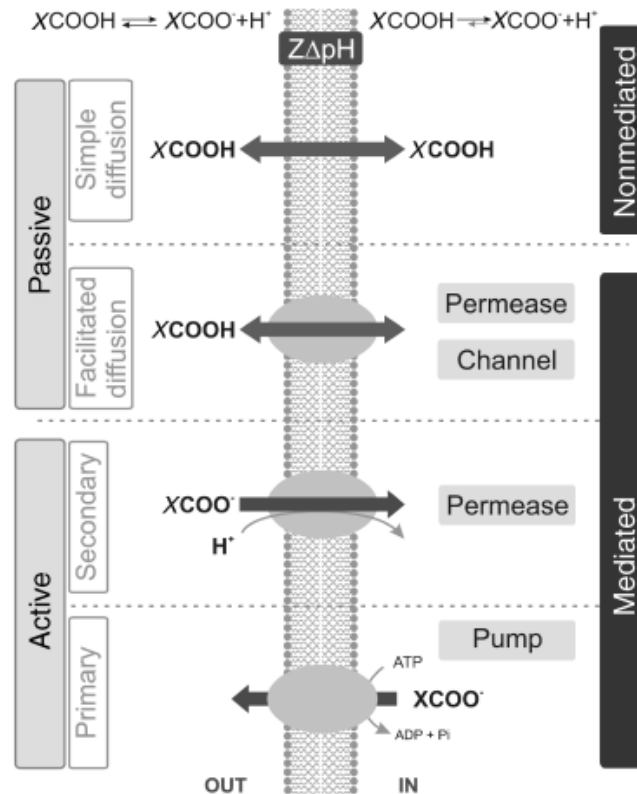
#### 4.2.1.2. Le transport passif des AGVs par diffusions simple et facilitée

La diffusion simple est la diffusion d'un soluté au travers d'une membrane dans le sens des fortes concentrations vers les faibles concentrations (gradient de concentration), jusqu'à atteindre un équilibre des concentrations des deux côtés de la membrane (figure I-10). Ce type de diffusion est caractéristique d'un transport passif, indépendant de l'énergie. La diffusion simple nécessite que le soluté soit soluble dans la bicouche de phospholipides constitutive de la membrane : il doit donc être hydrophobe ou apolaire. Dans le cas des AGVs, la forme indissociée, non chargée et liposoluble, est par conséquent celle qui sera transportée dans la cellule via ce mécanisme de transport (Casal et al., 2008). Ce phénomène a été observé chez la levure *Zygosaccharomyces bailii*. L'acide acétique ainsi que l'acide propionique, sous leurs formes indissociées, peuvent diffuser librement à travers la membrane de cette levure (Sousa et al., 1996). L'acide acétique traverse également par diffusion simple les membranes de *Saccharomyces cerevisiae* (Casal et al., 1996). Dans le cytoplasme, l'acide est confronté au pH intracellulaire proche de la neutralité et se dissocie, libérant ainsi un proton et sa base conjuguée. L'accumulation de protons dans le cytoplasme cause une acidification du milieu intracellulaire affectant le métabolisme de la cellule, modifiant les conformations des protéines (Pace et al., 1990), libérant des radicaux libres (Piper et al., 2001) et pouvant mener à la mort cellulaire.

L'acétate issu de la dissociation de l'acide peut également s'accumuler au sein de la cellule et impacter le métabolisme de la cellule. Etant chargée, cette molécule ne peut diffuser librement hors de la cellule et son accumulation peut causer une augmentation de la pression de turgescence (Piper et al., 2001). Une augmentation de la quantité d'anions au sein de la cellule peut également entraîner un stress oxydatif sévère chez *S. cerevisiae* (Piper, 1999) mais également inhiber ses



fonctions métaboliques. L'un des moyens développés par la levure pour expulser ces anions est la mise en place de pompes d'efflux de type ATPase consommatrices d'énergie.



**Figure I-10. Représentation schématique des mécanismes de transport des acides gras volatils à travers la membrane plasmique (d'après Casal et al., 2008).**

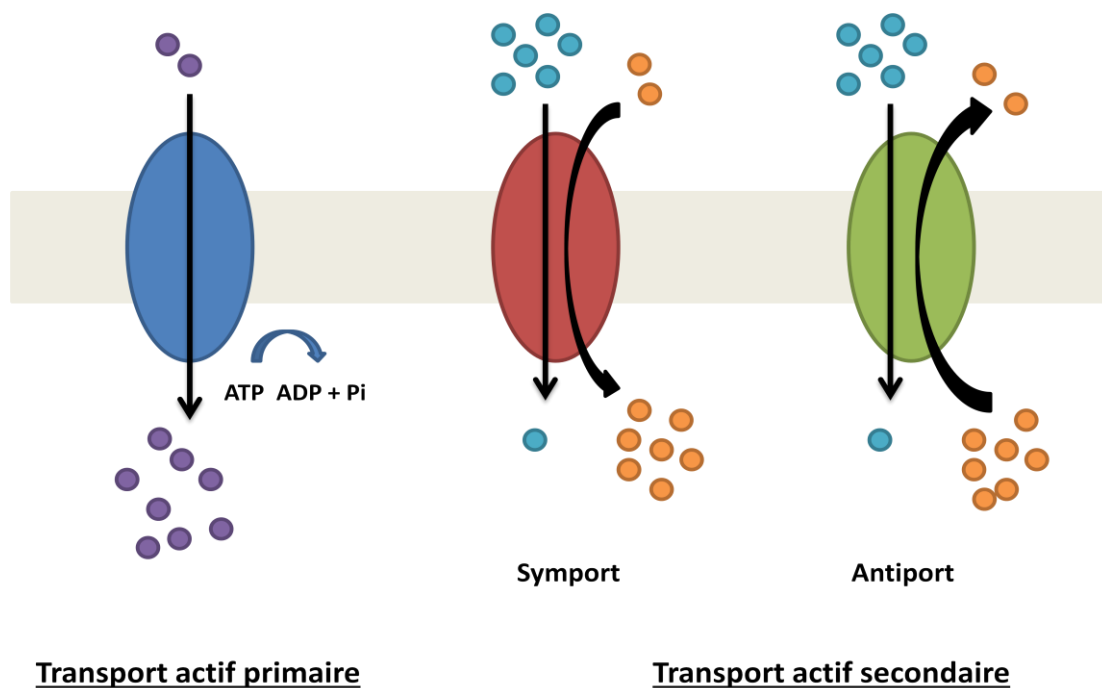
La forme indissociée (représentée ici par  $XCOOH$ ) peut traverser la membrane grâce à des mécanismes de transport passif : diffusion simple et diffusion facilitée par un canal ou une protéine de type perméase. La forme anionique ( $XCOO^-$ ) entre dans la cellule via des perméases protonotrices. Il s'agit d'un transport actif secondaire, faisant intervenir un symport. Le pH intracellulaire étant neutre, l'acide se dissocie et s'accumule sous sa forme anionique. L'anion peut être expulsé du cytoplasme par une pompe de type ATP-ase (transport actif primaire).

Un deuxième type de système d'entrée de l'acide acétique par transport passif a été identifié chez *S. cerevisiae*. Il s'agit d'un transport de type diffusion facilitée (figure I-10). Le moteur de la diffusion facilitée est le gradient de concentration (comme la diffusion simple). Mais la diffusion facilitée ne s'opère que via des protéines transmembranaires intrinsèques qui sont spécialisées dans le transport de solutés spécifiques. Dans le cas de l'acide acétique, son transport peut être assuré via l'aquaglycéroporine Fps1 chez *S. cerevisiae* (Mollapour and Piper, 2007). Il est également intéressant de noter que lorsque ces levures sont exposées à des concentrations en acide acétique de 80 à 100

mM et à un pH de 4,5, la protéine Fps1 est désactivée par l'action d'une kinase MAPK-HOG1, empêchant l'entrée d'acide acétique dans la cellule par ce moyen.

#### 4.2.1.3. Transport actif des AGVs

La forme indissociée des AGVs peut donc pénétrer la cellule via des systèmes de transport passif. Lorsque le pH du milieu de culture est supérieur au  $pK_A$ , alors la forme dissociée prédomine dans le milieu. Cependant, cette forme chargée négativement ne peut diffuser librement à travers les membranes et doit donc être prise en charge par des transporteurs de type actif (figure I-11).



**Figure I-11. Mécanismes de transport actif.**

Le transport actif primaire utilise l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter des molécules à travers la membrane contre leur gradient de concentration. Le transport actif secondaire utilise l'énergie mise en jeu pour le transfert d'une espèce dans le sens de son gradient de concentration pour transporter un deuxième soluté dans la même direction (symport) ou dans le sens opposé (antiport).

Deux types de transports actifs existent. Le transport actif primaire qui utilise de l'énergie par hydrolyse de l'ATP pour transporter des molécules à travers la membrane contre leur gradient de concentration et le transport actif secondaire qui lui utilise la différence de potentiel électrochimique. Le principe du transport actif secondaire est qu'il utilise l'énergie mise en jeu pour le transfert d'une espèce dans le sens de son gradient de concentration pour transporter un deuxième soluté dans la même direction (symport) ou dans le sens opposé (antiport).

Chez les levures, plusieurs symports alimentés par une force proto-motrice ont été mis en évidence. Cependant la plupart de ces symports ne sont pas spécifiques d'une espèce d'acide en particulier mais sont capables de reconnaître et de transporter dans la cellule différents types de molécules. Dès 1987, Cassio et ses collaborateurs ont mis en évidence l'existence d'un symport chez *S. cerevisiae* permettant l'entrée de l'acétate dans la cellule. Ce même symport transporte également le lactate, le pyruvate et le propionate qui sont par conséquent des inhibiteurs compétitifs de l'acétate (Cássio et al., 1987). Ce transporteur, identifié comme étant une perméase, est codé par le gène JEN1 (Casal et al., 1999). Une deuxième perméase assurant le transport de l'acétate, du propionate et du formate a été mise en évidence par Casal et al. (1996). L'activité de ce deuxième transporteur est sous la répression du glucose, il est par conséquent activé lorsque les levures sont cultivées sur des sources de carbone non fermentescibles tel que l'acétate. C'est en 2004 que Paiva et ses collaborateurs ont mis en évidence que cette perméase était codée par le gène ADY2/YCR010C et la protéine produite nommée Ady2p. Une délétion du gène ADY2/YCR010C affecte le transport de l'acétate dans les mutants de *S. cerevisiae* et l'acide acétique ne pénètre alors la cellule que par diffusion simple (Paiva et al., 2004). Il est intéressant de constater qu'un homologue de ce gène existe chez la levure oléagineuse *Yarrowia lipolytica* sous le nom de GPR1. Cependant chez *Y. lipolytica*, une inactivation de ce gène n'entraîne pas une atténuation du transport de l'acétate mais une altération de la sensibilité de la cellule au substrat (Tzschoppe et al., 1999). La levure *Torulaspora delbrueckii* présente également un symport proto-moteur pouvant transporter l'acétate, le propionate ainsi que le formate (Casal and Leão, 1995). Chez la levure *Z. bailii*, deux types de symports coexistent, l'un étant très spécifique à l'acétate tandis que le second transporte également le propionate et le formate (Sousa et al., 1996). Il est intéressant de noter que l'activité de ces symports est dépendante de la source de carbone présente dans le milieu de culture. En effet, lorsque les levures sont cultivées dans un milieu enrichi en glucose et contenant de l'acétate, seul le transporteur spécifique de l'acétate est opérationnel tandis que des cultures réalisées uniquement sur acide acétique entraînent l'activation du transporteur de plusieurs carboxylates (Sousa et al., 1996). L'activité du symport spécifique de l'acétate est inhibée en présence d'éthanol et la présence d'acétate dans l'espace intracellulaire n'est alors due qu'à la diffusion libre de l'acide acétique à travers les membranes (Sousa et al., 1996). Cette même équipe a également montré que l'activité des symports était sous le rétrocontrôle négatif exercé par l'acétate intracellulaire (Sousa et al., 1998). L'augmentation de la concentration d'acétate intracellulaire entraîne la diminution de la vitesse de consommation de l'acétate, due à l'inactivation du système d'entrée du substrat.

Peu de données sont disponibles sur le mécanisme d'entrée du butyrate dans la cellule. Chez la bactérie *Clostridium acetobutylicum*, l'acétate et le butyrate sont à la fois transférés du milieu vers le

cytoplasme et convertis en butanol via une seule et même enzyme transférase (Hartmanis et al., 1984). Cependant, au vu des données disponibles chez les levures, il est concevable de penser que la prise en charge du butyrate est assurée par un transporteur actif similaire à ce qui est observé chez *S. cerevisiae*, *T. dubruelckii* et *Z. bailii* pour l'acétate et le propionate.

#### **4.2.2. Assimilation des AGVs dans le métabolisme**

L'assimilation des AGVs dans le métabolisme résulte de l'association de plusieurs voies métaboliques. Un schéma général représentant les voies d'assimilation connues pour la consommation des trois principaux AGVs (acétate, propionate et butyrate) chez la levure (d'après Paiva et al., 2004) est proposé figure I-12.

##### **L'acétate**

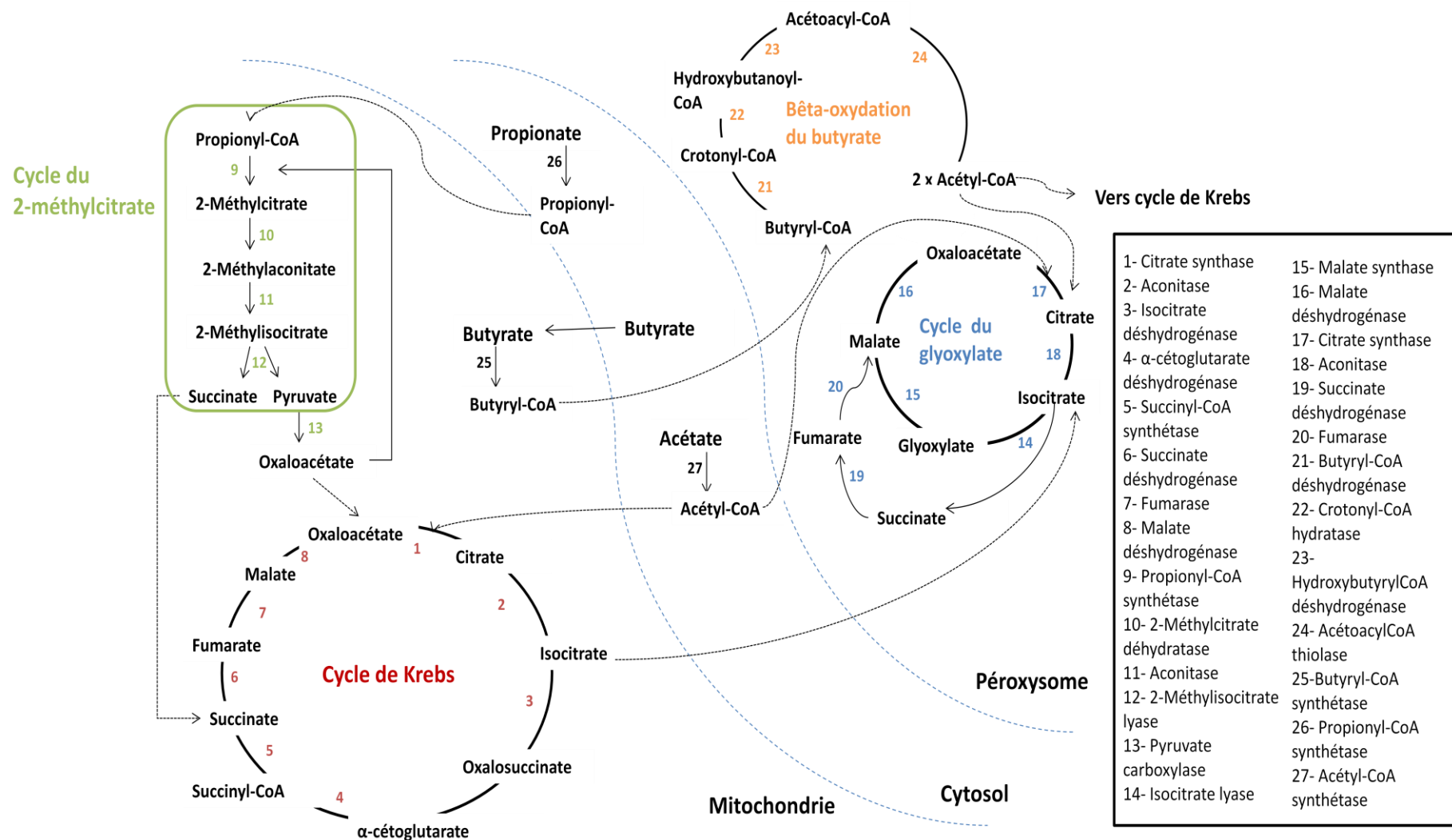
Dans le cytoplasme, l'acétate est clivé en acétyl-coA avec libération d'une molécule d'AMP et une molécule de Ppi, sous l'action d'une acétyl-coA synthétase cytosolique (Lee et al., 2011). L'acétyl-coA peut ensuite entrer dans le cycle de Krebs et le cycle du glyoxylate.

##### **Le propionate**

Le propionate quant à lui est converti en propionyl-coA par une propionyl-coA synthétase. Cette réaction peut cependant être catalysée par l'acétyl-coA synthétase (Pronk et al., 1994). Le propionyl-coA intègre ensuite le cycle du 2-méthylcitrate. Le cycle du 2-méthylcitrate a pour objectif la conversion du propionyl-CoA en pyruvate. Chez *S. cerevisiae*, cette voie de dégradation du propionate est celle qui est majoritairement empruntée par rapport à une seconde voie : la voie du 2-méthylmalonylCoA (Pronk et al., 1994). Cette voie métabolique est retrouvée chez de nombreux champignons et bactéries (Muñoz-Elías et al., 2006; Muñoz-Elías and McKinney, 2006). La levure oléagineuse *Y. lipolytica* présente également ce cycle lui permettant de croître sur propionate (Tabuchi and Satoh, 1976).

##### **Le butyrate**

Le butyrate est dégradé dans un premier temps dans le péroxysome par la bêta-oxydation en vue de produire deux molécules d'acétyl-CoA. L'activation du butyrate a d'abord lieu dans le cytoplasme par formation d'une liaison thioester entre le groupement carboxyle de l'acide gras et le groupe thiol du coenzyme A, formant ainsi le butyryl-CoA. Cette réaction est catalysée par une butyryl-CoA synthétase. L'activation de l'acide gras est énergie-dépendante puisqu'elle nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Une fois activé, le butyrate entre alors dans le processus de bêta-oxydation.



**Figure I- 12. Cycles de Krebs, du 2-méthylcitrate et du glyoxylate et bêta oxydation du butyrate.** Sont représentées les voies d'assimilation connues pour la consommation des trois principaux AGVs (acétate, propionate et butyrate) chez la levure (d'après Paiva et al., 2004).

## 5. OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

Le travail présenté dans cette étude fait partie d'un projet de bioraffinerie dont l'objectif est la production de vecteurs énergétiques à partir de substrats lignocellulosiques (Figure I-13). Un premier compartiment est destiné à la production d'hydrogène par fermentation anaérobie assurée via un consortium microbien. Cette production d'hydrogène s'accompagne d'une production d'acides gras volatils (AGVs). Ces AGVs, filtrés par une membrane immergée à fibres creuses, seront amenés à un deuxième compartiment destiné à la culture et la production de lipides par les levures oléagineuses *Cryptococcus curvatus*. Les lipides extraits pourront être utilisés comme précurseurs de biodiesel. La biomasse résiduelle sera soit réincorporée dans le premier compartiment soit réutilisée lors de l'étape de production de levures.

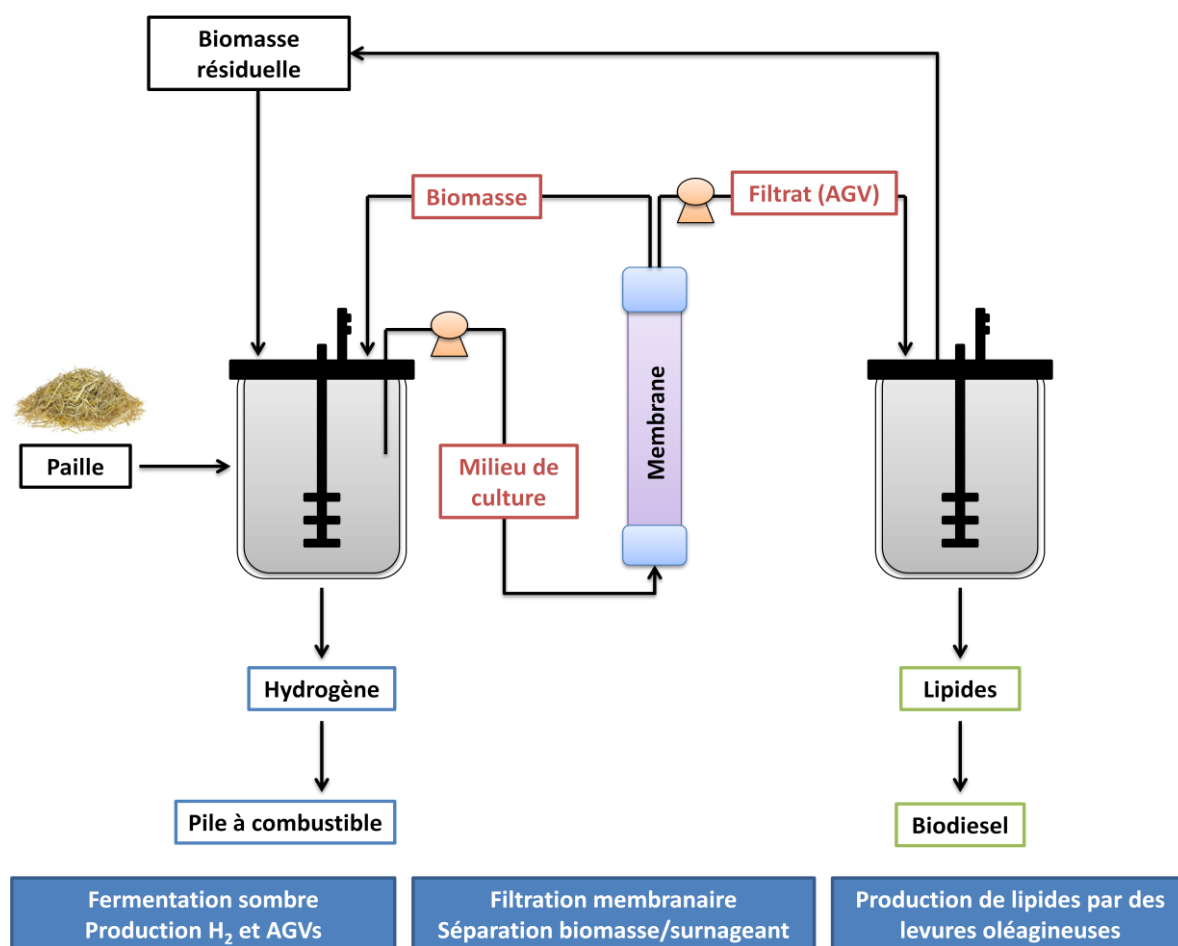


Figure I-13. Schéma du projet de bioraffinerie.

Ce travail de thèse se concentre en particulier sur la deuxième partie du projet de bioraffinerie qui est la production de biomasse et de lipides de la levure *C. curvatus* sur acides gras volatils. Des

travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont montré qu'une culture de *Cryptococcus curvatus* pouvait accumuler sur acétate, au terme de 50h de procédé, une teneur en lipides de 50,9 % de la masse sèche (Christophe et al., 2012). Ces résultats encourageants confirment la possibilité d'utiliser l'acétate comme substrat carboné pour l'accumulation de lipides. Cependant, la concentration finale en biomasse obtenue (13,5 g/L) ainsi que les rendements de conversion d'acétate en composés d'intérêt doivent encore être améliorés afin d'avoir un procédé compétitif. A partir des résultats précédemment obtenus (Christophe et al., 2012 ; Fontanille et al., 2012), l'objectif est d'améliorer les performances en termes de productions de biomasse et de lipides, et d'augmenter les rendements et productivités de ces paramètres à partir d'acétate.

Trois grands volets seront abordés au cours de cette étude :

(i) dans un premier temps, l'optimisation des paramètres opératoires (diminution de la toxicité du substrat par modification du pH de culture ; recherche des rapports C/N du milieu les plus favorables à la production de biomasse et de lipides ; stratégie d'alimentation du réacteur) de cultures de *C. curvatus* en fed-batch sur acétate synthétique sera présentée.

(ii) Dans un second temps, à partir des résultats obtenus au cours des cultures réalisées en mode fed-batch, un modèle de croissance et de production de lipides de la levure *C. curvatus* à partir d'acétate a été construit. Une fois validé, ce modèle a été utilisé en tant qu'outil de prédiction afin d'identifier les paramètres opératoires (taux de dilution et rapport C/N du milieu d'alimentation) favorisant la productivité en lipides lors de cultures réalisées en mode continu. Une comparaison des meilleurs résultats obtenus à l'issue des cultures en continu et en fed-batch nous permettra de discuter de l'efficacité de ces modes de culture pour la production de biomasse et de lipides à partir de ce substrat non conventionnel.

(iii) En dernier lieu les cultures de *C. curvatus* utilisant du surnageant de culture anaérobie. Une première partie sera consacrée à la mise au point d'un milieu de culture minimal à partir de surnageant permettant d'obtenir des cinétiques de croissance et des rendements de conversion en biomasse similaires à ceux obtenus au cours des cultures réalisées sur milieu synthétique. Dans un second temps, la validité du bioprocédé à deux compartiments (production d'hydrogène suivie de la synthèse de lipides) sera testée et des mesures envisageables pour son amélioration présentées dans une dernière partie.

## **CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES**



## 1. CONDITIONS DE CULTURE

### 1.1. Description de la souche utilisée

La souche de levure oléagineuse mise en culture au cours de cette étude est *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. Elle est conservée dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Potato Dextrose Agar (PDA) dont la composition est présentée dans tableau II-1. La souche est entretenue par repiquages périodiques toutes les deux semaines.

**Tableau II-1. Composition du milieu de culture PDA.**

Composé	Concentration (g/L)
Dextrose	20
Potato	200
Agar	20

### 1.2. Description des milieux utilisés

#### 1.2.1. Milieux de préculture et de culture

Le milieu de culture utilisé pour les précultures et les cultures en réacteur est un milieu minéral dont la composition est décrite dans le tableau II-2. Le milieu de culture en réacteur et la source de carbone (variable selon la culture) sont stérilisés séparément.

Le pH du milieu de culture en réacteur est ajusté à 4,5 à l'aide d'acide orthophosphorique  $H_3PO_4$  avant stérilisation afin d'éviter la précipitation des éléments minéraux. Il est ensuite réajusté à pH 6 ou 7 à l'aide d'une solution de KOH 5N stérile après autoclave. La source de carbone est ensuite ajoutée au milieu.

Le milieu de préculture (réalisée en fioles Erlenmeyer) est directement mélangé à la source de carbone avant stérilisation. Le pH du milieu de culture est alors ajusté à la valeur désirée (6 pour les précultures sur glucose et certains tests de préculture sur acétate) ou 7 (précultures sur acétate) à l'aide de KOH 5N. Le milieu est alors stérilisé par filtration grâce à des filtres (Unité de filtration Stéritop 0,20  $\mu m$ , Merck Millipore, Allemagne) et récupéré dans une bouteille préalablement autoclavée.

**Tableau II- 2. Composition du milieu de culture liquide**

Composé	Concentration (g/L)
$K_2HPO_4$	3,000
$NaH_2PO_4$ , $H_2O$	3,000
$(NH_4)_2SO_4$	3,000
$MgSO_4$ , $7H_2O$	1,000
$ZnSO_4$ , $7H_2O$	0,040
$FeSO_4$ , $7H_2O$	0,016
$MnSO_4$ , $H_2O$	0,0038
$CoCl_2$ , $6H_2O$	0,0005
$CuSO_4$ , $5H_2O$	0,0009
$Na_2MoO_4$ , $2H_2O$	0,00006
$CaCl_2$ , $2H_2O$	0,023
$H_3BO_3$	0,003

### **1.2.2. Culture de *Cryptococcus curvatus* sur substrat modèle**

Au cours de cette étude, la levure oléagineuse *C. curvatus* a été cultivée en aérobiose, à 30°C, sur un milieu de culture minéral additionné de glucose ou d'acides gras volatils (AGVs) synthétiques. Ces cultures ont été menées en Erlenmeyer (culture sur glucose et sur acétate) et en fermenteur (culture sur acétate). En fermenteur, trois modes de cultures ont été utilisés : le batch, le fed-batch et le continu. Cependant, le milieu utilisé reste le même et seule la source de carbone varie.

#### **1.2.2.1. Sources de carbone**

Les sources de carbone utilisées au cours des précultures sont le glucose et l'acétate. Leurs concentrations initiales sont respectivement de 20 g/L et de 5 g/L. Lors des cultures en bioréacteur, seul l'acétate est utilisé comme source de carbone, comme représentant des autres AGVs.

#### **1.2.2.2. Milieux d'alimentation utilisés pour les cultures en fed-batch**

Au cours des cultures en fed-batch, des ajouts de substrats sont réalisés afin de ne pas limiter la culture en carbone et en azote et de contrôler le rapport C/N du milieu.

### *Fed-batch séquentiel*

Un premier type de culture en bioréacteur a été réalisé avec un contrôle classique du pH par ajouts automatiques d'une solution d'hydroxyde de potassium KOH 5N ou d'une solution d'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. Cette première culture est réalisée selon un mode fed-batch séquentiel. En effet, les ajouts de substrats carbonés et azotés sont réalisés ponctuellement à partir de milieux d'alimentation concentrés A et B. Les compositions de ces milieux d'alimentation sont décrites dans le tableau III-3.

**Tableau II-3. Composition des milieux d'alimentation utilisés au cours de la culture en mode fed-batch séquentiel.**

Nom du milieu d'alimentation	A	B
	Milieu azoté	Milieu carboné
Composé	Concentration (g/L)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,000	3,000
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	3,000	3,000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150,000	0,000
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,000	1,000
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,040	0,040
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,016	0,016
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	0,0038	0,0038
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,0005	0,0005
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,0009	0,0009
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,00006	0,00006
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,023	0,023
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,003	0,003
Acide acétique	0,000	800,000

### *Fed-batch*

Dans un second temps, le système d'alimentation du réacteur a été modifié. La consommation de l'acétate par les levures entraîne une élévation du pH du milieu de culture. La solution classique d'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilisée pour réajuster le pH en cours de culture a alors été remplacée par des milieux d'alimentation concentrés en acétate, qui sont donc ajoutés au milieu dès lors que le pH

s'éloigne de sa valeur de consigne de 0,05 unité pH. Ceci a donné lieu à une deuxième série de cultures en bioréacteur utilisant ce nouveau système de régulation du pH. Plusieurs solutions ont été utilisées durant cette série de cultures. Leur composition est décrite dans le tableau II-4.

**Tableau II- 4. Composition des milieux d'alimentation utilisés au cours des cultures en mode fed-batch.**

Milieu d'alimentation	C	D
Caractéristiques	C/N	Solution d'acétate
	10/1	
Composé	Concentration (g/L)	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,000	3,000
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	3,000	3,000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	133,000	0,000
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,000	1,000
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,040	0,040
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,016	0,016
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	0,0038	0,0038
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,0005	0,0005
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,0009	0,0009
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,00006	0,00006
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,023	0,023
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,003	0,003
Extrait de levure	1,800	1,800
Acide acétique	700,000	700,000

Les rapports C/N discutés dans ce travail représentent des rapports de concentrations entre la concentration en carbone présente dans le milieu sur la concentration en azote résiduelle. Par exemple, pour le milieu d'alimentation C présenté dans ce tableau, celui-ci a été déterminé de la façon suivante : le carbone représente 40% de la molécule d'acide acétique et l'azote 21% de la molécule de sulfate d'ammonium. Par conséquent :

$$\frac{C}{N} = \frac{700 \times 40\%}{133 \times 21\%} = \frac{280}{27,93} = 10$$

Les rapports C/N présentés dans la suite de ce manuscrit ont tous été calculés de la même façon.

#### *1.2.2.3. Solution de vitamines*

Lors des cultures en fed-batch, une solution de vitamines stérilisée par filtration (0,20 µm) est ajoutée au milieu de culture (1‰ v/v) dès lors que la concentration en biomasse augmente de 10 g/L.

Sa composition est la suivante (en g/L) : d-biotine 0,05 ; panthotenate 1 ; acide nicotinique 1 ; thiamine hypochloride 1 ; acide p-amino benzoïque 0,2 ; pyridoxine 1 ; inositol 25.

#### *1.2.2.4. Milieux d'alimentation utilisés au cours des cultures en continu*

Au cours des cultures en continu, deux milieux d'alimentation présentant des rapports C/N différents ont été utilisés. Les compositions de ces milieux d'alimentation sont décrites dans le tableau II-5.

**Tableau II-5. Composition des milieux d'alimentation utilisés au cours des cultures en mode continu.**

Nom du milieu d'alimentation	E	F
C/N	C/N 10	C/N 50
Composé	Concentration (g/L)	
$K_2HPO_4$	3,000	3,000
$NaH_2PO_4$ , $H_2O$	3,000	3,000
$(NH_4)_2SO_4$	3,800	3,800
$MgSO_4$ , $7H_2O$	1,000	1,000
$ZnSO_4$ , $7H_2O$	0,040	0,040
$FeSO_4$ , $7H_2O$	0,016	0,016
$MnSO_4$ , $H_2O$	0,0038	0,0038
$CoCl_2$ , $6H_2O$	0,0005	0,0005
$CuSO_4$ , $5H_2O$	0,0009	0,0009
$Na_2MoO_4$ , $2H_2O$	0,00006	0,00006
$CaCl_2$ , $2H_2O$	0,023	0,023
$H_3BO_3$	0,003	0,003
Acide acétique	20,000	100,000

### **1.2.3. Cultures de *Cryptococcus curvatus* sur surnageant de culture**

#### **1.2.3.1. Sources de carbone**

Des cultures en batch et en fed-batch de la levure oléagineuse *C. curvatus* ont été réalisées en utilisant des surnageants issus de fermentation anaérobie productrice d'hydrogène. Les principaux acides gras volatils retrouvés dans ces surnageants sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Le lactate peut également être présent. Ces fermentations anaérobies, menées à l'aide d'un consortium microbien, ont été réalisées en utilisant du glucose comme source de carbone initiale. Les compositions des deux types de surnageant employés sont détaillées dans le tableau II-6.

**Tableau II- 6. Composition des surnageants issus de cultures anaérobies productrices d'hydrogène.**

Identification	Méthode d'obtention	Concentration (g/L)				
		Acétate	Propionate	Butyrate	Total AGVs	Lactate
<b>Surnageant 1</b>	Filtration membranaire	2,5	4,3	17,8	24,6	ND
<b>Surnageant 2</b>	Filtration membranaire	4,5	0,1	18,2	22,8	1,7

Ces surnageants ont tous deux été obtenus par filtration du milieu de culture anaérobie via une membrane de microfiltration (seuil de coupure 0,22 µm). Le surnageant 1 a été employé lors de cultures en batch tandis que le surnageant 2 a été utilisé pour une culture réalisée en fed-batch.

#### *1.2.3.2. Composition des milieux utilisés lors des précultures en Erlenmeyer*

Les précultures en Erlenmeyer de *C. curvatus* ont été réalisées à partir de surnageant dilué au quart afin de limiter l'effet toxique des AGVs présents. Une seule préculture a été réalisée pour les cultures en batch tandis que deux précultures successives présentant des concentrations en AGVs croissantes ont été réalisées pour la culture en fed-batch. La composition des différents milieux de culture utilisés en fioles Erlenmeyer est détaillée dans le tableau II-7.

Le pH du milieu de préculture est ajusté à pH 7 à l'aide de KOH 5N. Le milieu est alors stérilisé par filtration grâce à des filtres (Unité de filtration Stéritop 0,20 µm, Merck Millipore, Allemagne) et récupéré dans une bouteille préalablement autoclavée.

**Tableau II-7. Composition des milieux de culture utilisés pour les cultures en fioles Erlenmeyer.**

Composition (g/L)	Préculture 1	Préculture 1	Préculture 2
Surnageant utilisé (dilué au quart)	1	2	2
Acétate	0,625	1,125	2,25
Butyrate	4,450	4,55	9,1
Propionate	1,075	0,025	0,05
Lactate		0,425	0,85
Ions ammonium	0,035	0,062	0,123
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	3		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3		
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1		
Solution métallique et éléments traces <sup>a</sup>	a		
(NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub>		3	3
MgCl <sub>2</sub> , 7H <sub>2</sub> O		1	1

<sup>a</sup> Solution métallique et d'éléments trace : (en g/L) ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 0,040 ; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 0,016 ; MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 0,0038 ; CoCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O 0,0005 ; CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O 0,0009 ; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O 0,00006 ; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O 0,023 ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,003.

### 1.2.3.3. Composition des milieux utilisés lors des cultures en bioréacteur

Une série de cultures en batch des levures *C. curvatus* a été menée, utilisant les AGVs du surnageant 1 comme source de carbone. Ce surnageant a été utilisé dilué au quart pour chacune des cultures. Des sels minéraux ont ensuite été rajoutés au milieu afin de déterminer les composés essentiels à la croissance de la souche. Le détail des compositions des milieux de culture est présenté dans le tableau II-8.

Une culture en fed-batch utilisant le surnageant 2 a été menée. Le détail de la composition du milieu de culture est également présenté dans ce tableau II-8.



Tableau II- 8. Composition des milieux utilisés au cours de ce travail.

Surnageant utilisé		Surnageant 1					Surnageant 2	
Nom	Surnageant 1	Témoin négatif	Témoin positif	Surnageant + N	Surnageant + N, Mg	Surnageant + N, Mg, P	Surnageant 2	Milieu réacteur
Mode de culture		Batch	Batch	Batch	Batch	Batch		Fed-batch
Composition (g/L)	Acétate	2,500	0,625	0,625	0,625	0,625	4,500	2,250
	Butyrate	17,800	4,450	4,450	4,450	4,450	18,200	9,100
	Propionate	4,300	1,075	1,075	1,075	1,075	0,100	0,050
	Lactate						1,700	0,850
	Ions ammonium	0,141	0,035	0,035	0,035	0,035	0,246	0,123
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Nd	<sup>b</sup>	<sup>b</sup> + 3	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>	<sup>b</sup> + 3	Nd
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	Nd	<sup>b</sup>	<sup>b</sup> + 3	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>	<sup>b</sup> + 3	Nd
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Nd	<sup>b</sup>	<sup>b</sup> + 3	<sup>b</sup> + 3	<sup>b</sup> + 3	<sup>b</sup> + 3	Nd
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	Nd	<sup>b</sup>	<sup>b</sup> + 1	<sup>b</sup>	<sup>b</sup> + 1	<sup>b</sup> + 1	Nd
	Solution métallique et éléments traces <sup>a</sup>	Nd	<sup>b</sup>	<sup>b</sup> + a	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>	Nd
	(NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub>	Nd	<sup>b</sup>				Nd	<sup>c</sup> + 3
	MgCl <sub>2</sub> , 7H <sub>2</sub> O	Nd	<sup>b</sup>				Nd	<sup>c</sup> + 1

<sup>a</sup> Solution métallique et d'éléments trace : (en g/L) ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 0,040 ; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 0,016 ; MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 0,0038; CoCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O 0,0005; CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O 0,0009; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O 0,00006; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O 0,023 ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,003.

<sup>b</sup> les concentrations en éléments présents dans le surnageant sont diluées au quart lors des cultures de levures en bioréacteur.

<sup>c</sup> les concentrations en éléments présents dans le surnageant sont diluées au demi lors des cultures de levures en bioréacteur.

### **1.3. Mise en culture**

#### **1.3.1. Précultures sur substrat modèle**

Des cultures en fioles Erlenmeyer sont utilisées comme précultures destinées à l'inoculation des bioréacteurs. 50 mL (pour les cultures en batch) ou 400 mL (pour les cultures en fed-batch et en continu) de milieu minéral, additionnés de glucose (20 g/L) ou d'acétate (5 g/L), sont préparés en fioles Erlenmeyer. Les milieux sont ensuiteensemencés par prélèvement sur boîte de Pétri de colonies de la souche utilisée de façon à obtenir une densité optique initiale comprise entre 0,1 et 0,2 (lecture au spectrophotomètre à 600 nm). La préculture est ensuite incubée à 30°C sous une agitation de 100 rpm pendant 24h. Cette préculture est ensuite transférée stérilement dans le bioréacteur.

#### **1.3.2. Précultures sur substrat réel**

Des précultures destinées aux cultures en bioréacteur ont été réalisées en fioles Erlenmeyer. Les milieux sont inoculés par suspension à l'aide de colonies de la souche utilisée de façon à obtenir une densité optique initiale comprise entre 0,1 et 0,2 (lecture au spectrophotomètre à 600 nm).

Les précultures destinées aux cultures en batch sont réalisées de manière identique dans un volume de 150 mL. La préculture est ensuite divisée en trois afin d'ensemencer simultanément trois réacteurs dans les mêmes conditions.

La préculture destinée à la culture en fed-batch a été réalisée en deux temps. Dans un premier temps, la préculture 1 (composition présentée dans le tableau II-8) a été inoculée par suspension de trois œses pleines à partir de cultures de *C. curvatus* fraîches sur boîte de Pétri. Lorsque la DO atteint une valeur de 1, 40 mL de cette préculture sont repiqués dans un deuxième Erlen, formant la préculture 2 (composition présentée dans le tableau II-8). Cette deuxième préculture est ensuite transférée stérilement dans le réacteur.

Toutes les précultures sont incubées dans une étuve agitée à 100 rpm, à 30°C pendant 24h.

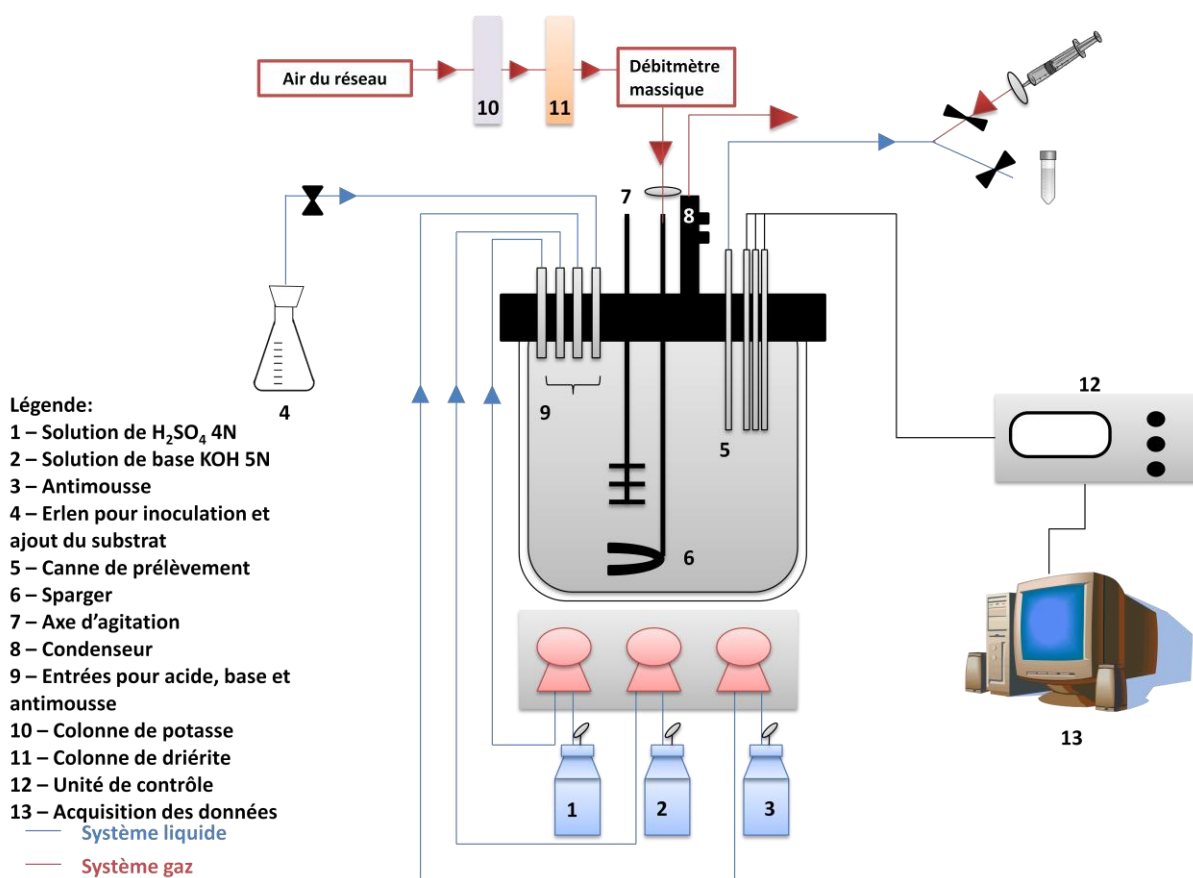
#### **1.3.3. Cultures en bioréacteur**

##### **1.3.3.1. Culture en batch**

###### **1.3.3.1.1. Description du réacteur et système de commande et régulation**

Le système utilisé est un ensemble de deux paires de bioréacteurs (INFORS HT, Suisse) identiques de 500 mL de volume utile, permettant de mener simultanément plusieurs cultures dans des conditions similaires. Un schéma représentant ce réacteur est présenté dans la figure II-1. Chaque bioréacteur est équipé d'une sonde pH, d'un régulateur de température, d'une sonde mesurant l'oxygène

dissous ( $pO_2$ ), d'un système d'aération et d'un système magnétique d'agitation. L'air est préalablement filtré à l'aide d'un filtre stérilisable ( $0,22\ \mu m$ ) avant d'être injecté dans le réacteur. Le pH du milieu de culture est réajusté à 6 ou 7 après stérilisation par ajout d'une solution d'hydroxyde de potassium 5N puis maintenu à son point de consigne pendant la culture à l'aide d'une solution d'acide sulfurique  $H_2SO_4$  4N. La température est maintenue à  $30^\circ C$  par un système chauffant entourant le réacteur. L'appareillage utilise la version NT5 pour Windows du logiciel IRIS (INFORS HT) permettant de fixer les valeurs de régulation.



**Figure II-1.** Schéma du réacteur en mode de culture batch.

#### 1.3.3.1.2. Préparation du réacteur

Le volume de culture final est fixé à 500 mL (comprenant les précultures de 50 mL ajoutées avant démarrage du réacteur). La température de culture est fixée à  $30^\circ C$  et le pH maintenu à 6 (lors des cultures déterminant l'influence du pH sur la croissance des levures) ou 7. Le débit d'aération initial est de 0,2 L/min et la vitesse d'agitation de 250 rpm. Quelques gouttes d'antimousse sont ajoutées au milieu avant démarrage du réacteur afin d'éviter la formation de mousse. Une cascade

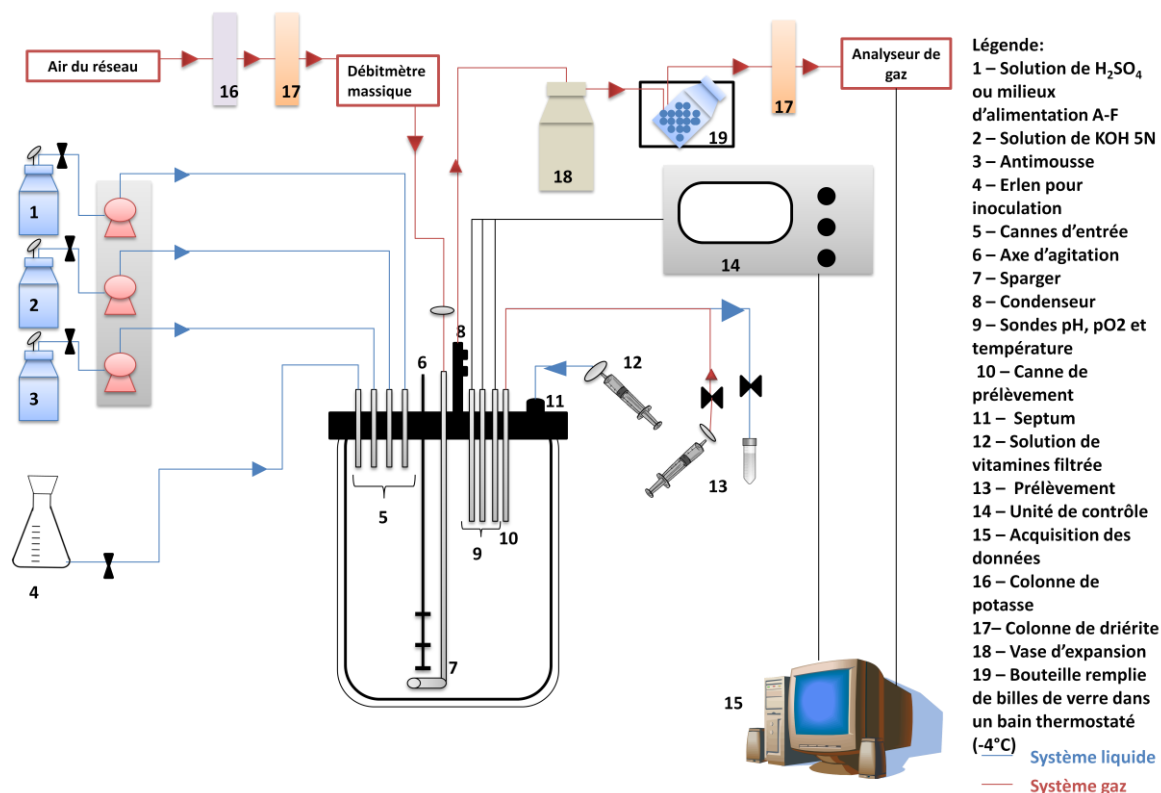
aération/agitation est programmée pour maintenir une pression partielle en oxygène dissous supérieure à 50 %. Pour cela, le débit d'aération va varier de 0,2 à 1,5 L/min et, si nécessaire, l'agitation de 250 à 1000 rpm.

Le réacteur est alors prêt à être inoculé de manière stérile. Par la suite, des prélèvements sont régulièrement réalisés afin de suivre l'évolution de la culture.

### *1.3.3.2. Culture en fed-batch*

#### *1.3.3.2.1. Description du réacteur et système de commande et régulation*

Ce système a été utilisé pour des cultures sur substrat modèle et sur substrat réel. Le système utilisé est un bioréacteur (GPC-CBIO, La Rochelle, France) de 5 L de volume utile. Un schéma représentant ce réacteur est présenté dans la figure II-2. Le réacteur est équipé d'une sonde pH, d'un régulateur de température, d'une sonde mesurant l'oxygène dissous ( $pO_2$ ), d'un système d'aération et d'un système d'agitation. L'air entrant est préalablement filtré à l'aide d'un filtre stérilisable de 0,22  $\mu m$  et il est débarrassé de  $CO_2$  par passage sur une colonne de pastilles de KOH. La vitesse d'agitation et le débit d'aération en début de culture sont fixés à 400 rpm et 0,5 L/min. Au cours des cultures, ces valeurs sont augmentées jusqu'à un maximum de 1000 rpm et 2 L/min. Après stérilisation du bioréacteur, le pH est réajusté à 6 (cultures en mode fed-batch séquentiel) ou à 7 (culture en mode fed-batch) par ajout d'une solution de potasse (KOH 5N). Au cours de la culture, le pH est maintenu à sa valeur de consigne par ajout d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$  4N) pour les cultures réalisées sur substrat réel et en mode fed-batch séquentiel ou de milieu d'alimentation concentré en acétate pour les cultures réalisées en mode fed-batch (cf. partie 1.2.2.2.). La température est maintenue à 30°C grâce à un système de double enveloppe. Le suivi de la consommation d'oxygène et de la production de dioxyde de carbone est assuré par un analyseur de gaz (ZRE gas analyser, Fuji Electric, Japan). L'acquisition des données ainsi que la gestion des valeurs de consigne sont assurées par le logiciel C-Bio (La Rochelle, France).



**Figure II- 2.** Schéma du réacteur en mode de culture fed-batch.

#### 1.3.3.2.2. Préparation du réacteur et conduite de culture sur substrat modèle

400 mL de milieu minéral additionné de glucose ou d'acétate sont préparés en fioles Erlenmeyer comme décrit précédemment. Ces fioles sont utilisées comme précultures pour le démarrage des cultures en réacteur. Différentes stratégies de culture ont été utilisées au cours de cette étude. Elles sont détaillées dans les paragraphes suivants et récapitulées dans le tableau II-9.

##### *Culture en deux phases en fed-batch séquentiel*

Lors des cultures en deux phases en fed-batch séquentiel, la préculture est réalisée dans du milieu minéral additionné de glucose et à pH 6. Cette préculture est ensuite apportée au réacteur. Une première étape consiste à produire une quantité importante de biomasse à partir d'acétate (concentration initiale de 5 g/L). Le fed-batch est assuré grâce à des ajouts réguliers de milieux d'alimentation A (milieu azoté) et B (milieu carboné) (compositions présentées dans le Tableau II-3) grâce à des pompes péristaltiques. Ces ajouts sont programmés grâce à un minuteur et en fonction des vitesses de consommation des substrats azotés et carbonés déterminées au cours de la culture. La deuxième étape est dédiée à l'accumulation de lipides par les microorganismes toujours à partir

d'acétate et en condition de limitation par l'azote. Au cours de cette phase, le fed-batch est assuré par ajout du milieu d'alimentation B seul, entraînant ainsi la limitation par l'azote.

#### *Cultures en deux phases réalisées selon un mode fed-batch*

Au cours de ces cultures, la préculture est réalisée à partir de milieu minéral additionné d'acétate (5 g/L), à pH 7.

La consommation d'acétate étant directement liée à une augmentation du pH du milieu de culture, il a été décidé d'utiliser les milieux d'alimentation en tant que solution d'acide classiquement utilisée pour la régulation du pH.

En réacteur, la culture se déroule en deux étapes selon un mode fed-batch et utilisant le système de régulation pH décrit précédemment. La concentration initiale de substrat dans le réacteur est de 5 g/L. Le pH est maintenu à 7. La première étape consiste à produire de la biomasse sur acétate. Le milieu C (composition présentée dans le tableau II-4) est utilisé afin d'alimenter la culture en substrats carbonés et azotés. La deuxième étape est destinée à la production de lipides sur acétate par limitation des apports azotés. Les ajouts sont assurés par le milieu D (solution concentrée en acétate).

#### *Production de biomasse*

La phase de production de biomasse sur acétate, utilisant le système de régulation du pH précédemment décrit, a été optimisée au cours de cette culture. La solution d'alimentation utilisée à ces fins est le milieu C décrit dans le tableau II-4.

**Tableau II- 9. Récapitulatif des différentes stratégies de cultures utilisées lors des cultures en fed-batch en bioréacteur.**

Type de culture	Fed-batch séquentiel	Fed-batch associé au nouveau système de régulation pH	Préculture	pH de culture	Phase 1 : Croissance sur acétate	Phase 2 : Production de lipides sur acétate
<b>Culture en deux phases</b>	Oui		Réalisée sur glucose (concentration initiale : 20 g/L)	6	Concentration initiale : 5 g/L Ajouts de substrats carbonés et azotés à partir des milieux d'alimentation A et B	Ajouts de substrats carbonés et azotés à partir du milieu d'alimentation B
<b>Culture en deux phases</b>		Oui	Réalisée sur acétate (concentration initiale : 5 g/L)	7	Concentration initiale : 5 g/L Ajout du milieu d'alimentation C	Ajout du milieu d'alimentation D
<b>Production de biomasse</b>		Oui	Réalisée sur acétate (concentration initiale : 5 g/L)	7	Concentration initiale : 5 g/L Ajout du milieu d'alimentation C	Non

#### *1.3.3.2.2. Préparation du réacteur et conduite de culture sur substrat réel*

Le surnageant 2 a été utilisé pour cette culture (composition présentée dans le tableau II-6). Deux précultures successives sont réalisées en fioles Erlenmeyer afin que la souche de levures oléagineuses *C. curvatus* s'adapte à ce substrat.

En réacteur, la température de culture est fixée à 30°C. Le pH est maintenu à 7 par ajout automatique d'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. Les conditions initiales d'agitation et d'aération sont fixées à, respectivement, 500 rpm et 0,5 L/min et évoluent au cours de la culture afin de maintenir la pO<sub>2</sub> au-dessus de 20%. La culture s'effectue en deux phases. Dans un premier temps, la culture se déroule en mode batch avec consommation des AGVs présents initialement dans le milieu. Lorsque la concentration d'AGVs atteint 2 g/L, 800 mL du surnageant 2 non dilué sont ajoutés au milieu de culture afin d'augmenter le rapport C/N du milieu et d'induire une production de lipides. Des prélèvements sont régulièrement collectés afin d'assurer le suivi de culture de la souche.

#### *1.3.3.3. Cultures en continu*

##### *1.3.3.3.1. Description du réacteur*

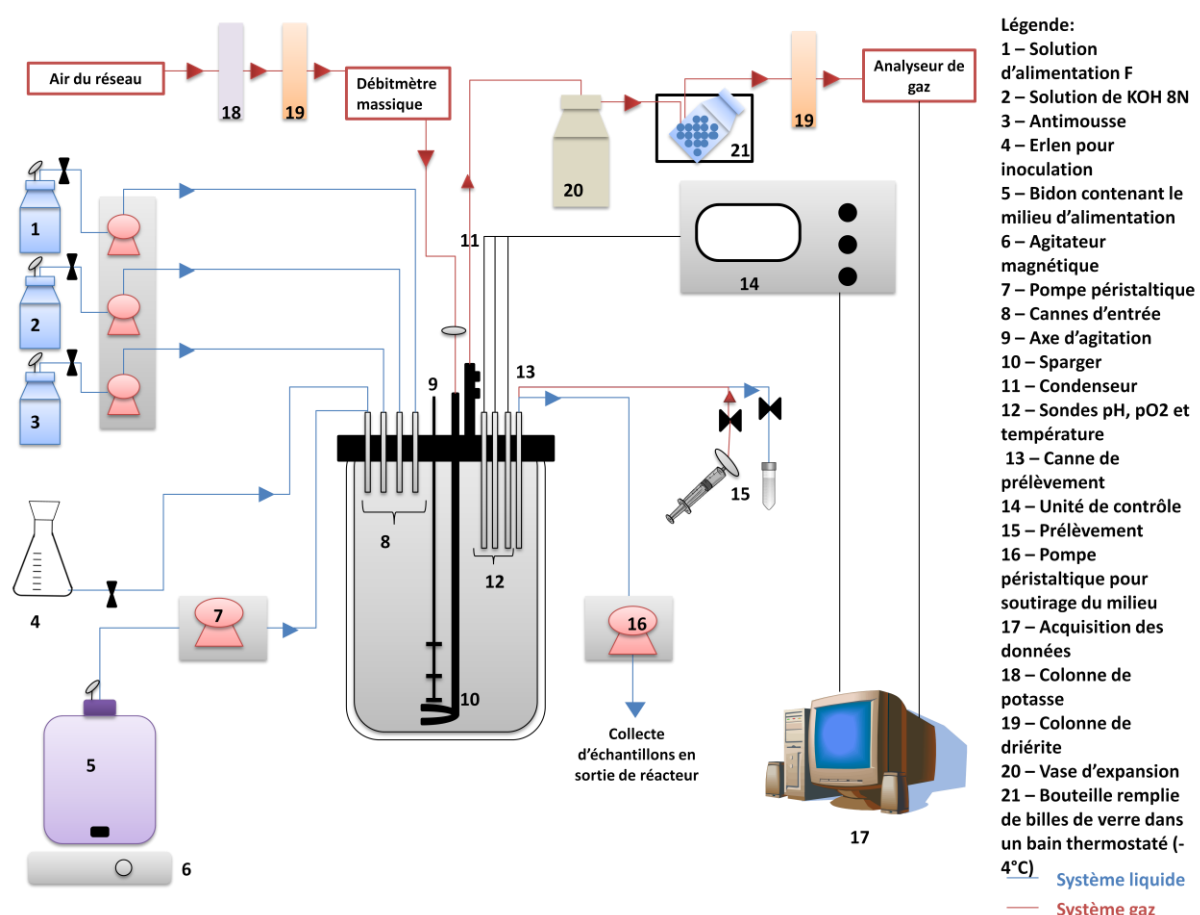
Les cultures en continu sont réalisées uniquement à partir du substrat modèle, dans un fermenteur B. Braun (Biostat MD, B. Braun, Allemagne) de 5 L de volume utile, équipé d'un contrôle de température, d'un système d'agitation et d'aération, d'une sonde pH ainsi que d'une sonde pO<sub>2</sub>. Une entrée placée sur la platine permet d'amener le milieu d'alimentation au cours de la phase continue tandis qu'une canne de prélèvement réglée de façon à maintenir le volume du réacteur à 4 L permet le soutirage du milieu de culture lorsque le volume excède la valeur désirée. La température est maintenue à 30°C au cours de la culture. Après stérilisation du bioréacteur, le pH du milieu de culture est ajusté à 7 par ajouts d'une solution de KOH 8N. La culture débute par une phase de production de biomasse en mode fed-batch, utilisant le système de régulation du pH précédemment utilisé. Durant cette première phase de production, le pH est maintenu à 7 à l'aide du milieu d'alimentation C (décrit dans le tableau II-4). Au cours de la phase continue, la régulation du pH est uniquement assurée par l'ajout automatique d'une solution de KOH 8N. Les milieux d'alimentation sont amenés au réacteur via une pompe péristaltique et le soutirage est assuré par une seconde pompe réglée au même débit en sortie de réacteur. Un schéma représentant ce réacteur est présenté dans la figure II-3.

Les conditions d'agitation et d'aération sont initialement fixées à respectivement 400 rpm et 0,5 L/min puis sont modifiées au cours de la culture afin de maintenir la pO<sub>2</sub> au point de consigne désiré.



Le suivi de la consommation d'oxygène et de la production de dioxyde de carbone est assuré par un analyseur de gaz Oxymat 6E (Siemens, Karlsruhe, Allemagne).

L'acquisition des données ainsi que la gestion des valeurs de consigne sont assurées par le logiciel MFCS Win 2-0 (B. Braun, Allemagne).



**Figure II- 3.** Schéma du réacteur en mode continu.

#### 1.3.3.3.2. Préparation du réacteur et déroulement des cultures

400 mL de milieu minéral supplémenté en acétate (5 g/L) sont préparés en fioles Erlenmeyer comme décrit précédemment et inoculés par trois oëses pleines d'une culture fraîche de *C. curvatus* cultivée sur milieu PDA en boîte de Pétri. Le contenu de la fiole constitue l'inoculum de la culture en continu et est transféré stérilement au réacteur. Deux types de culture continue sont présentés dans ce travail : une culture au cours de laquelle les rapports C/N des milieux d'alimentation varient et une culture au cours de laquelle la pO<sub>2</sub> au sein du réacteur varie.

Ces cultures débutent de la même façon : par une phase de fed-batch, dans les conditions décrites en **1.3.3.2.2.** dans la section *Production de biomasse* afin de fournir une concentration importante de biomasse. La phase continue est alors mise en place.

#### *Variation des rapports C/N des milieux d'alimentation*

Au cours de cette culture, la  $pO_2$  est fixée à 50%. Un premier milieu d'alimentation E présentant un rapport C/N de 10 (composition décrite dans le tableau II-5) est apporté au milieu de culture à l'aide d'une pompe péristaltique. Le taux de dilution choisi est  $0,04\text{ h}^{-1}$ . Le temps de séjour est de 25h. Le régime permanent est atteint au bout de 3 à 4 temps de séjour et il est maintenu durant 3 temps de séjour. Un deuxième milieu d'alimentation F présentant un rapport C/N de 50 (tableau II-5) est ensuite apporté au milieu de culture via la même pompe péristaltique. Le taux de dilution ainsi que la période allouée à la mise en place du continu restent les mêmes. Parallèlement à l'apport continu de milieu d'alimentation, une deuxième pompe externe permet le soutirage continu du milieu de culture afin de maintenir le volume du milieu de culture à 4L. Deux à trois échantillons sont prélevés chaque jour en sortie de réacteur afin d'être analysés et d'obtenir le suivi de culture de la souche.

#### *Variation de la $pO_2$*

Le milieu d'alimentation F est utilisé au cours cette culture. Le taux de dilution est de  $0,04\text{ h}^{-1}$ . Le temps de séjour est de 25h. Le régime permanent est atteint au bout de 3 à 4 temps de séjour et il est maintenu durant 3 temps de séjour. Au cours d'une première phase, les conditions d'agitation et d'aération ont été choisies de façon à ce que la valeur de la  $pO_2$  soit nulle. Pour ce faire, l'agitation et le débit d'aération sont fixés à, respectivement, 800 rpm et 0,8 L/min. Au cours d'une seconde phase, la  $pO_2$  est réglée à 20%. Pour cela, la vitesse d'agitation est augmentée à 1000 rpm et le débit d'aération à 1 L/min.

## **2. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS**

Lors du suivi des cultures, des prélèvements de la phase liquide sont régulièrement réalisés. Des états frais sont fréquemment effectués sur ces prélèvements afin de vérifier l'axénicité des cultures ainsi que l'état morphologique des levures (accumulation de gouttelettes lipidiques). Une partie de chaque prélèvement est utilisée pour le dosage des métabolites par HPLC. Une autre partie est centrifugée 10 minutes à 10 000g puis filtrée à  $0,20\text{ }\mu\text{m}$  afin de séparer efficacement la phase solide de la phase liquide. Les surnageants sont conservés pour les dosages d'ions ammonium et d'oses neutres. Les culots sont quant à eux utilisés pour la détermination des poids secs.

## 2.1. Analyse de la biomasse

La biomasse est analysée via la mesure de la densité optique à 600 nm au spectrophotomètre SAFAS UV mc2 (Safas, Monaco).

Les poids secs sur la phase solide sont réalisés en centrifugeant 5 mL de milieu pendant 10 minutes à 10 000 g en tubes pré-séchés à 110°C pendant 24h et pré-pesés. Après élimination du surnageant, ces tubes sont ensuite placés à 110°C jusqu'à stabilisation de leurs masses (environ 24h). La concentration de la biomasse, exprimée en g/L, est alors mesurée par gravimétrie. Ces mesures de poids secs comparées aux mesures spectrophotométriques permettent d'établir une corrélation DO600nm/poids secs utilisable pour suivre la croissance au cours des cultures.

## 2.2. Dosage des métabolites par HPLC

Afin de suivre la consommation du glucose et des AGVs, les échantillons sont analysés par HPLC (High Performance Liquid Chromatography). La chaîne utilisée est constituée de deux colonnes d'exclusion ionique montées en série (Phénomenex Rezex ROA 300 x 7,8 mm) et placées dans un four thermostaté à 50°C. L'éluant est une solution à 2 mM d'acide sulfurique dans de l'eau ultra-pure (Millipore, MilliQ Plus) dégazée à l'aide d'un dégazeur (Ney, Ultrasonik 300) intégré à l'appareillage. Le débit est fixé à 0,7 mL/min à l'aide d'une pompe (HP série 100, Agilent Technologies). L'appareil est muni d'un injecteur automatique. La détection des divers composés est assurée par un réfractomètre (HP série 1100). L'acquisition et l'intégration sont réalisées grâce à un logiciel (HP Chem, Agilent Technologies). 2 mL d'échantillon sont dé-protéinisés afin d'éviter l'encrassement de la colonne. Pour cela, 250 µL d'une solution de baryte ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$  0,3 M) et 250 µL d'une solution de sulfate de zinc ( $\text{ZnSO}_4$  5% p/v) sont ajoutés à l'échantillon. Ces deux composés entraînent une précipitation des protéines présentes dans le milieu. Après une centrifugation de 5 min à 10 000 g, le surnageant est filtré sur un filtre en acétate de cellulose (0,20 µm) et transféré dans des vials. Les échantillons peuvent alors être analysés.

Les composés quantifiables par cette méthode sont le glucose, le citrate, le lactate, l'acétate, le propionate, le butyrate, le valérate et l'isovalérate, pour lesquels des gammes étalons ont été établies.

## 2.3. Dosage des ions ammonium

Les ions ammonium, en présence de javel et de phénol, développent une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en ions  $\text{NH}_4^+$  (Patton et Crouch, 1977).

50 µL du filtrat obtenu à la suite de chaque prélèvement sont ajoutés à 500 µL de javel (Sigma 640-3), 500 µL de phénol nitroprussiate (Sigma 640-1) et 3 mL d'eau distillée. L'ensemble est vortexé puis placé une heure à l'obscurité. L'absorbance est prise à 570 nm contre une gamme étalon de solutions de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  de 0 à 80 mg N/L.

## **2.4. Dosage des oses neutres**

Les liaisons glycosidiques subissent une hydrolyse, à chaud, en présence d'acide sulfurique. La déshydratation des unités osidiques conduit à la formation de composés furfuriques. Ces derniers interagissent avec les composés phénoliques (résorcinol) par condensation pour former des composés absorbant à 450 nm (Monsigny et al., 1988).

200 µL de résorcinol et 1 mL d'acide sulfurique 80% (p/v) sont ajoutés à 200 µL de filtrat. Le mélange est incubé à 90°C pendant 30 minutes puis refroidi à l'obscurité pendant 30 minutes supplémentaires. Chaque échantillon est dilué à l'aide de 1,4 mL d'eau ultra-pure et l'absorbance est mesurée à 450 nm (SAFAS UV mc2, Safas, Monaco). Une gamme étalon est préparée à l'aide d'une solution de glucose avec des concentrations en oses variant de 0 à 0,3 g/L.

## **2.5. Extraction et analyse des lipides**

### **2.5.1. Prétraitement de la biomasse**

Afin de rendre les lipides cellulaires plus accessibles aux solvants, une étape de broyage a été mise au point. L'appareil utilisé est un broyeur TS HAIVA (Constant Systems LTD, Royaume-Uni). Le broyage est effectué sur un échantillon de 5 mL. Afin de broyer une concentration de biomasse constante, les échantillons de culture sont concentrés ou dilués de manière à broyer des échantillons contenant 20 à 25 g/L de biomasse. L'échantillon est alors placé dans la cuve du broyeur et subit un cycle de broyage sous une pression de 2500 bars. Le broyat est ensuite utilisé pour les extractions lipidiques.

### **2.5.2. Méthode d'extraction des lipides**

La méthode d'extraction utilisée dans ce travail a été mise au point au laboratoire. 0,5 mL de l'échantillon broyé sont ajoutés à 4 mL de chloroforme, 2 mL de méthanol et 1 mL d'eau distillée. Une centrifugation à 4°C de 10 minutes à 2000 g permet la séparation de deux phases. La phase organique contenant les lipides est récupérée dans un tube pré-séché à 110°C et pré-pesé. Après évaporation du solvant au speed-vacuum, les lipides sont alors quantifiés par gravimétrie.

### **2.5.3. Analyse de la fraction lipidique**

La composition en lipides de la biomasse est déterminée et quantifiée par chromatographie en phase gazeuse. Les lipides extraits doivent être préalablement estérifiés. La transestérification s'effectue en

présence de MeOH/BF<sub>3</sub> 14% (Méthanol/Boron trifluoride, FLUKA/CAS 373-57-9). 100 µL d'échantillon sont ajoutés à 800 µL de MeOH/BF<sub>3</sub> et incubés pendant 15 minutes dans un bain-marie à 100°C. Après refroidissement à température ambiante, 1,5 mL d'eau distillée et 750 µL d'hexane sont ajoutés. Après homogénéisation au vortex pendant 2 minutes et décantation, la phase organique est récupérée dans un vial afin d'être injectée en GC.

L'appareil utilisé est une chromatographie en phase gazeuse (Agilent, HP 5890 série II) munie d'une colonne capillaire SOB-S (0,25 cm x 30 m x 0,25 µm) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Le gaz vecteur est l'azote. L'injecteur et le détecteur sont tous deux définis à 260°C. Le split ratio est de 1:20 (v/v). Les paramètres de la méthode sont : une température initiale de 140°C pendant 5 minutes puis une augmentation de température de 4°C/min jusqu'à 240°C et maintien de cette température jusqu'à la fin de cette méthode qui dure 35 minutes. L'identification des acides gras estérifiés a été réalisée par comparaison des temps de rétention obtenus avec ceux de standards connus.

### **3. TRAITEMENT DES DONNEES EXPERIMENTALES**

#### **3.1. Calculs de rendements**

Pour chaque métabolite, nous avons mesuré soit l'évolution de la concentration en fonction du temps (graphiquement), soit les quantités initiales et finales. Le tableau II-10 présente les données utilisées pour calculer les rendements de culture à partir des quantités initiales et finales. Les quantités de substrats consommés ont également été déterminées. La proportion de carbone contenu dans chaque métabolite et substrat a été calculée. Dans le cas de la biomasse et des lipides, elle a été estimée à partir d'une valeur moyenne. Pour les lipides, nous avons considéré la proportion de carbone dans l'acide oléique qui est l'acide gras le plus représenté parmi ceux produits au cours des cultures.

Les rendements par rapport aux substrats sont ensuite calculés. Le tableau II-11 présente les formules utilisées pour la détermination des rendements massiques et molaires en biomasse, lipides et CO<sub>2</sub> par gramme d'acétate consommé.

**Tableau II- 10. Variables mesurées au cours de la culture.**

Métabolite/ Substrat	Désignation	Unité	Quantité initiale	Quantité finale	Pourcentage de carbone contenu dans le métabolite	
					Valeur (%)	Références
Biomasse	X	g	$X_i$	$X_f$	50	Estimation de la proportion de carbone dans la biomasse
Lipides	L		$L_i$	$L_f$	77	Proportion de carbone dans l'acide oléique, acide gras majoritaire présent
CO <sub>2</sub>	C		$C_i$	$C_f$	27	Proportion de carbone dans le CO <sub>2</sub>
Acétate consommé	Ac		$Ac_i$	$Ac_f$	40	Proportion de carbone dans l'acétate
Butyrate consommé	Bu		$Bu_i$	$Bu_f$	55	Proportion de carbone dans le butyrate
Propionate consommé	Pr		$Pr_i$	$Pr_f$	49	Proportion de carbone dans le propionate
Biomasse en régime permanent	$C_X$	g/L			50	Estimation de la proportion de carbone dans la biomasse
Lipides en régime permanent	$C_L$				77	Proportion de carbone dans l'acide oléique
Acétate en régime permanent	$C_{AC}$				40	Proportion de carbone dans l'acétate
Acétate dans le bidon d'alimentation	$C_{AC0}$				40	Proportion de carbone dans l'acétate

**Tableau II- 11. Calculs des rendements massiques et molaires de culture.**

	Calcul	Formule	
		Rendement massique (g/g <sub>acétate consommé</sub> )	Rendement molaire (Cmol/Cmol <sub>acétate consommé</sub> )
Fed-batch	Rendement en biomasse totale	$\frac{X_f - X_i}{Ac_f - Ac_i}$	$\frac{(X_f - X_i) \times 0,50}{(Ac_f - Ac_i) \times 0,40}$
	Rendement en biomasse active (privée de lipides)	$\frac{(X_f - L_f) - (X_i - L_i)}{Ac_f - Ac_i}$	$\frac{(X_f \times 0,50 - L_f \times 0,77) - (X_i \times 0,50 - L_i \times 0,77)}{(Ac_f - Ac_i) \times 0,40}$
	Rendement en lipides	$\frac{L_f - L_i}{Ac_f - Ac_i}$	$\frac{(L_f - L_i) \times 0,77}{(Ac_f - Ac_i) \times 0,40}$
	Rendement en CO <sub>2</sub>	$\frac{C_f - C_i}{Ac_f - Ac_i}$	$\frac{(C_f - C_i) \times 0,27}{(Ac_f - Ac_i) \times 0,40}$
Continu	Rendement en biomasse totale	$\frac{C_X}{C_{AC0} - C_{AC}}$	$\frac{C_X \times 0,50}{(C_{AC0} - C_{AC}) \times 0,40}$
	Rendement en lipides	$\frac{C_L}{C_{AC0} - C_{AC}}$	$\frac{C_L \times 0,77}{(C_{AC0} - C_{AC}) \times 0,40}$

### 3.2. Détermination des paramètres du biodiesel

Des modèles mathématiques ont été développés afin de prédire les caractéristiques des biodiesels, en particulier l'indice de cétane, la viscosité cinématique, la densité, la chaleur de combustion et l'indice d'iode à partir des compositions en acides gras présents (Pereyra-Irujo et al., 2009; Ramos et al., 2009). Ces modèles sont présentés dans le tableau II-12. Les données utilisées pour ces calculs sont présentées dans le tableau II-13.

**Tableau II- 12. Modèles de prédiction des caractéristiques du biodiesel, formulées à partir des compositions en acides gras.**

Paramètre	Equation	Référence
Indice de cétane	$IC = \sum \frac{IC_{em} \%EM}{100}$	Ramos et al., 2009
Densité (kg/m <sup>3</sup> )	$\rho = \sum \frac{\rho_{em} \%EM}{100}$	Pereyra-Irujo et al., 2009
Chaleur de combustion (kJ/g)	$\Delta H_c = \sum \frac{\Delta H_{c_{em}} \%EM}{100}$	Pereyra-Irujo et al., 2009
Viscosité cinématique (mm <sup>2</sup> /s)	$\ln(v) = \sum \frac{\ln(v_{em}) \%EM}{100}$	Pereyra-Irujo et al., 2009
Indice d'iode (g <sub>I<sub>2</sub></sub> /100 g)	$II = \sum \frac{253.82 * DL * \%EM}{MM_{em}}$	Ramos et al., 2009
Stabilité oxydative (h)	$SO = \sum \frac{SO_{em} \%EM}{100}$	Ramos et al., 2009

EM : ester méthylé d'acide gras. MM : masse molaire. DL : nombre de doubles liaisons. La masse atomique de deux atomes d'iode qui se lient à une double liaison est de 253.82 g/mol. La fraction de chacun des esters méthylés présents dans le biodiesel est représentée par %EM.

**Tableau II- 13. Valeurs de paramètres des esters méthylés d'acides gras (<sup>a</sup> (Knothe, 2005) <sup>b</sup> (Lapuerta et al., 2010) <sup>c</sup> (Moser, 2009)).**

Ester méthylé d'acide gras	Formule	Masse molaire (g/mol)	Indice de cétane	Densité (kg/m <sup>3</sup> )	Viscosité cinématique (mm <sup>2</sup> /s)	Chaleur de combustion (kJ/g)	Stabilité oxydative (h)
Palmitate de méthyle	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270,46	74,5 <sup>a</sup>	852 <sup>b</sup>	4,32 <sup>b</sup>	39,47 <sup>a</sup>	>40 <sup>c</sup>
Palmitoléate de méthyle	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	268,44	51 <sup>a</sup>	875 <sup>b</sup>	3,67 <sup>a</sup>	39,32 <sup>a</sup>	2,1 <sup>c</sup>
Stéarate de méthyle	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	298,51	86,9 <sup>a</sup>	850 <sup>b</sup>	4,74 <sup>b</sup>	40,1 <sup>a</sup>	>40 <sup>c</sup>
Oléate de méthyle	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	296,49	59 <sup>a</sup>	874 <sup>b</sup>	4,51 <sup>b</sup>	39,93 <sup>a</sup>	2,5 <sup>c</sup>
Linoléate de méthyle	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	294,48	42,2 <sup>a</sup>	889 <sup>b</sup>	3,27 <sup>b</sup>	39,72 <sup>a</sup>	1 <sup>c</sup>

## 4. RECAPITULATIF

Les différentes techniques décrites ci-dessus peuvent être récapitulées comme suit et sont synthétisées dans le tableau II-14.

### Conditions de culture

- La souche étudiée est *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509.
- Trois types de substrats sont utilisés : du glucose, de l'acétate synthétique et des acides gras volatils contenus dans des surnageants de culture anaérobie. Le milieu de culture employé pour les cultures à base de glucose et d'acétate synthétique est un milieu minéral complet.

### Types de culture

- En mode batch afin de déterminer l'influence du pH de culture sur la croissance de la souche sur acétate.
- En mode fed-batch afin d'étudier l'influence des paramètres opératoires sur la production de biomasse et de lipides par *C. curvatus* sur acétate synthétique.
- En mode continu afin de tester l'influence du rapport C/N et de la limitation par l'oxygène sur la production de biomasse et de lipides de *C. curvatus*.
- En batch et fed-batch pour la culture de levures à partir de surnageants de culture anaérobie.

### Réacteurs utilisés

- Deux bioréacteurs de 5L de volume utile agités, régulés en température et équipés de sondes (pH, pO<sub>2</sub>), dotés d'une entrée et d'une sortie gaz avec analyseur de gaz et reliés à un système d'acquisition de données. L'un est utilisé pour les cultures en fed-batch (GPC C-Bio, La Rochelle, France), le deuxième pour les cultures en continu (Biostat MD, B. Braun, Allemagne).
- Deux paires de bioréacteurs (INFORS HT, Suisse) de 500 mL de volume utile, chacun étant équipé d'une sonde pH, d'un régulateur de température, d'une sonde mesurant l'oxygène dissous (pO<sub>2</sub>), d'un système d'aération et d'un système magnétique d'agitation. Ils sont employés pour les cultures en batch.

### Traitement des échantillons

- Détermination de la densité optique et des poids secs.
- Dosage des métabolites par HPLC.
- Dosage des ions ammonium.
- Dosage des oses neutres.
- Dosage des lipides et analyse des profils d'acides gras.
- Calculs des rendements de production



Tableau II- 14. Récapitulatif des manipulations présentées dans ce travail.

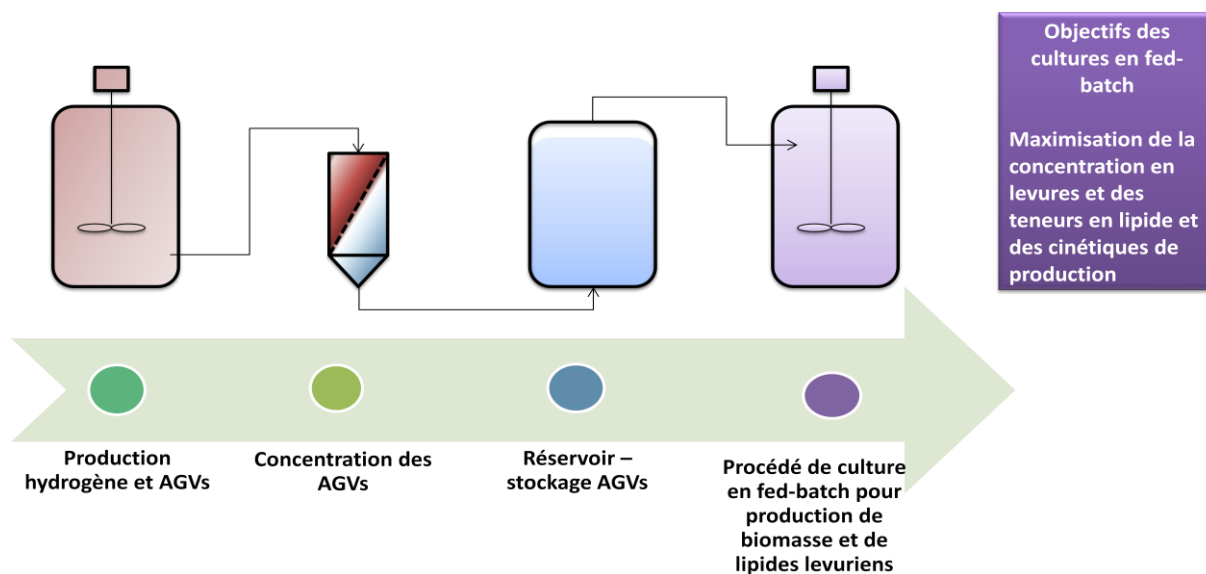
Substrat	Mode de culture	Support utilisé			Analyses réalisées							
		Erlen	Réacteur GPC-CBIO 5 L	Réacteur B. Braun 5 L	Réacteur INFORS 0.5 L	DO/MS <sup>c</sup>	HPLC <sup>d</sup>	N <sup>e</sup>	Oses <sup>f</sup>	Lip <sup>g</sup>	AG <sup>h</sup>	R <sup>g</sup>
Substrat modèle <sup>a</sup>	Batch	X			X	X	X	X		X		
	Fed-batch		X			X	X	X	X	X	X	X
	Continu			X		X	X	X	X	X	X	X
Substrat réel <sup>b</sup>	Batch				X	X	X	X		X	X	X
	Fed-batch		X			X	X	X		X	X	X

<sup>a</sup> Les substrats utilisés sont l'acétate ou le glucose. <sup>b</sup> Les substrats utilisés sont des AGVs issus de fermentation anaérobie productrice d'hydrogène.

<sup>c</sup> Détermination de la densité optique et des poids secs. <sup>d</sup> Dosage des métabolites par HPLC. <sup>e</sup> Dosage des ions ammonium.

<sup>f</sup> Dosage des oses neutres. <sup>g</sup> Dosage des lipides. <sup>h</sup> Analyse des profils d'acides gras. <sup>g</sup> Calculs des rendements.

**CHAPITRE III : ETUDE DES PARAMETRES  
OPERATOIRES INFLUANT SUR LA PRODUCTION  
DE LIPIDES PAR *CRYPTOCOCCUS CURVATUS* A  
PARTIR D'UN SUBSTRAT MODELE, L'ACETATE, EN  
CULTURE FED-BATCH**



**Figure III-1. Schéma du procédé de couplage.**

Après une étape de fermentation anaérobie productrice d'hydrogène et d'AGVs, les AGVs sont récupérés et concentrés. Ils sont ensuite utilisés comme source de carbone pour la production de biomasse et de lipides par la levure oléagineuse *Cryptococcus curvatus*.

## 1. AVANT-PROPOS DU CHAPITRE III

Ce travail de thèse repose sur la mise au point d'un procédé de production de lipides par la levure oléagineuse *Cryptococcus curvatus* à partir d'une solution d'acides gras volatils issus d'un compartiment de fermentation anaérobie producteur d'H<sub>2</sub>. La figure III-1 décrit le procédé de couplage envisagé à une échelle industrielle. Le surnageant issu de l'étape de fermentation anaérobie productrice d'H<sub>2</sub> contenant le mix d'AGVs est soutiré, concentré puis stocké dans une cuve tampon qui alimentera le compartiment producteur de lipides. De tels substrats, comparativement à des substrats plus classiques comme les oses, ont l'inconvénient d'avoir une toxicité élevée vis-à-vis des microorganismes. Comme il a été rappelé dans la première partie de ce document, un excès d'acide entraîne, lors de son entrée dans le microorganisme, un flux de protons au moment de sa dissociation pouvant provoquer la lyse des microorganismes. Cette contrainte nécessite alors automatiquement une conduite fine du procédé selon un mode fed-batch ou continu afin de limiter la toxicité de ces composés et d'envisager, à terme, une industrialisation du procédé.

D'autre part, l'accumulation de lipides chez les levures oléagineuses est principalement induite par des limitations nutritionnelles (Fontanille et al., 2012; Wu et al., 2011, 2010), et en particulier une limitation nutritionnelle en azote. Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier l'influence de ce paramètre qui est considéré comme la stratégie la plus prometteuse pour la production industrielle de lipides levuriens.

L'objectif de ce premier chapitre est de montrer la faisabilité du procédé de production de biomasse et de lipides à partir d'acétate synthétique en utilisant un procédé de type fed-batch. Ce substrat a été choisi pour sa représentativité importante dans les procédés de fermentation. Il sera donc utilisé pour la compréhension et la mise au point du procédé avant d'envisager l'utilisation de substrats plus complexes (Chapitre V). La production de lipides pour une valorisation comme biocarburant implique obligatoirement que le procédé mis en place réponde à des exigences industrielles en termes de productivité et de coût de production. La démarche utilisée consiste donc à comprendre puis à optimiser le procédé de production de type fed-batch en utilisant une stratégie qui repose sur la maximisation des concentrations finales en métabolites tout en tenant compte de la toxicité élevée du substrat.

Pour ce faire, les facteurs les plus influents sur la production de lipides par *C. curvatus* sur acétate ont été étudiés. La maximisation des concentrations en biomasse et en lipides repose principalement sur (i) une limitation de la toxicité de l'acétate lors de son assimilation, (ii) un mode d'alimentation des cultures fed-batch maîtrisé et (iii) un rapport carbone/azote (C/N) favorable à l'accumulation de

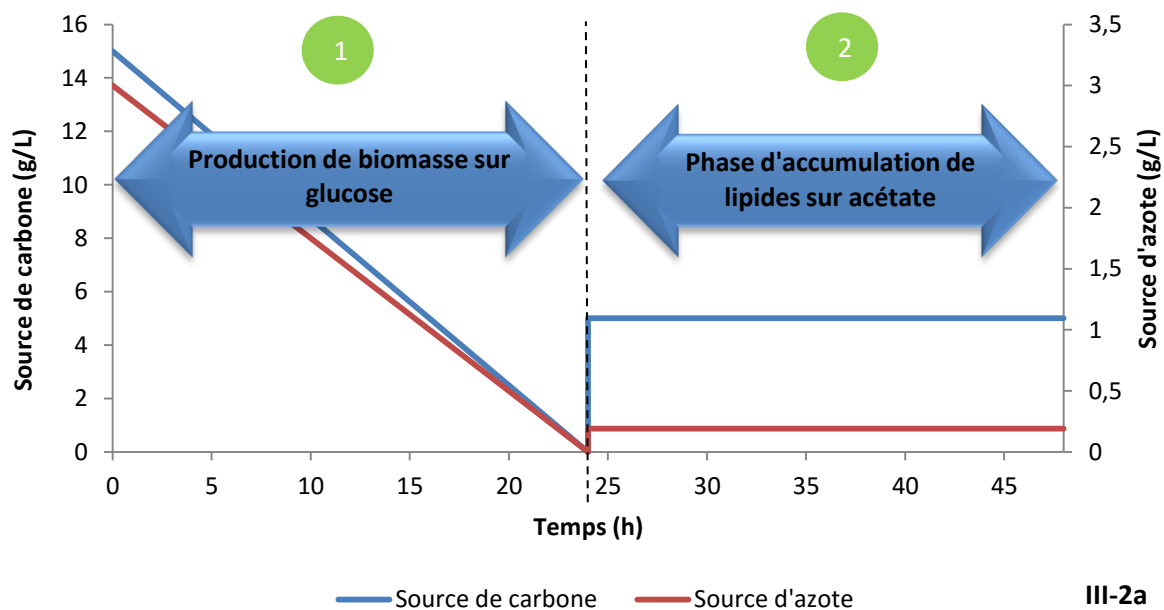
lipides. Dans ce chapitre, les stratégies envisagées seront détaillées dans une première partie. Les résultats majeurs obtenus seront présentés dans un article intitulé *Improvement and modeling of culture parameters to enhance biomass and lipid production by the oleaginous yeast Cryptococcus curvatus grown on acetate*, publié dans Bioresource Technology. Enfin, dans une dernière partie, les principales conclusions dégagées au cours de ce premier chapitre de résultats seront discutées.

## **2. STRATEGIES MISES EN PLACE POUR L'AMELIORATION DE LA PRODUCTION DE LIPIDES A PARTIR D'ACETATE PAR *CRYPTOCOCCUS CURVATUS* SELON UN MODE FED-BATCH**

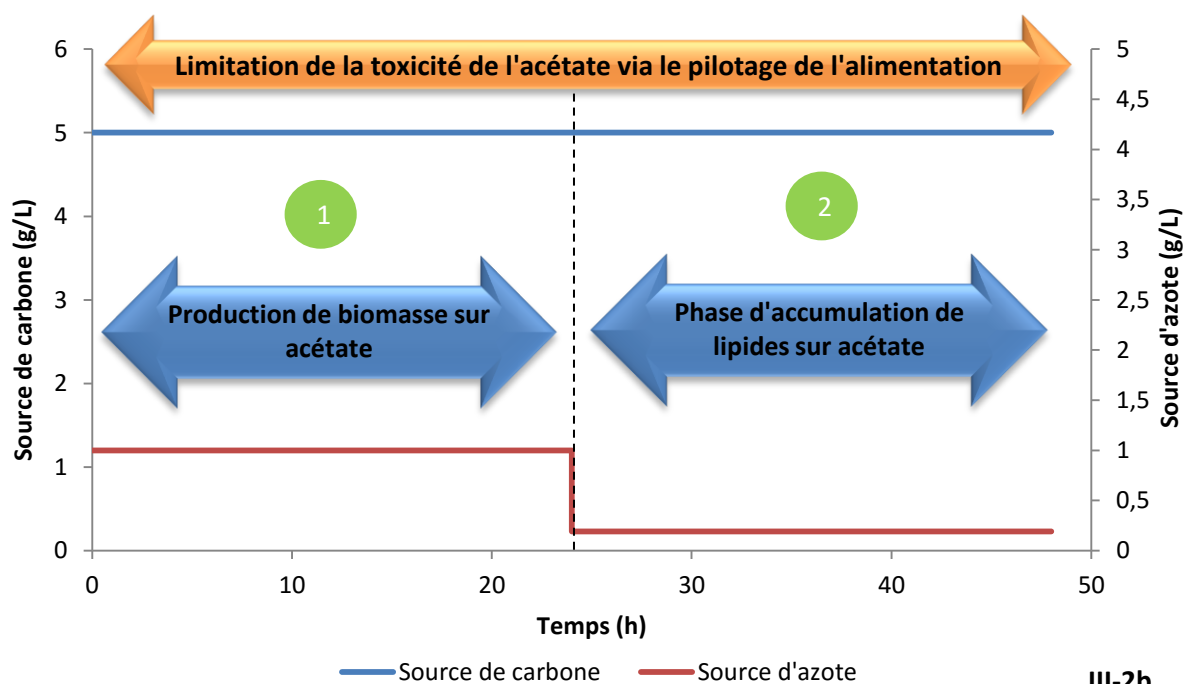
### **2.1. Stratégie expérimentale**

L'utilisation d'acétate synthétique comme substrat modèle impose d'envisager plusieurs stratégies expérimentales permettant de limiter la toxicité de ce type de molécule sur la croissance et l'accumulation de lipides. Des travaux préliminaires à cette étude ont été réalisés en utilisant une stratégie illustrée dans la figure III-2a. Dans une première étape, un sucre simple (glucose) est utilisé comme substrat carboné pour la phase de production de biomasse. Cette phase permet de produire rapidement de la biomasse non induite en forte quantité. L'acétate est ensuite utilisé pour la phase d'accumulation de lipides. Les résultats de cette culture sont rappelés dans le tableau III-1. Au terme de cette culture, une teneur en lipides de 51% a été obtenue. La productivité en biomasse au cours de la phase de croissance sur glucose s'élève à  $0,44 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

Dans cette étude, la stratégie envisagée repose sur l'utilisation d'un substrat unique pour l'ensemble du procédé, l'acétate (figure III-2b). Il est établi dans la littérature qu'une concentration initiale en acétate supérieure à 5 g/L est toxique pour la cellule (Fei et al., 2011b; Fontanille et al., 2012; Yahara et al., 2007). Une concentration proche de cette valeur sera donc maintenue dans le réacteur selon un procédé d'alimentation de type fed-batch. La concentration en azote deviendra limitante lors de la phase d'accumulation de lipides (figure III-2b).



III-2a



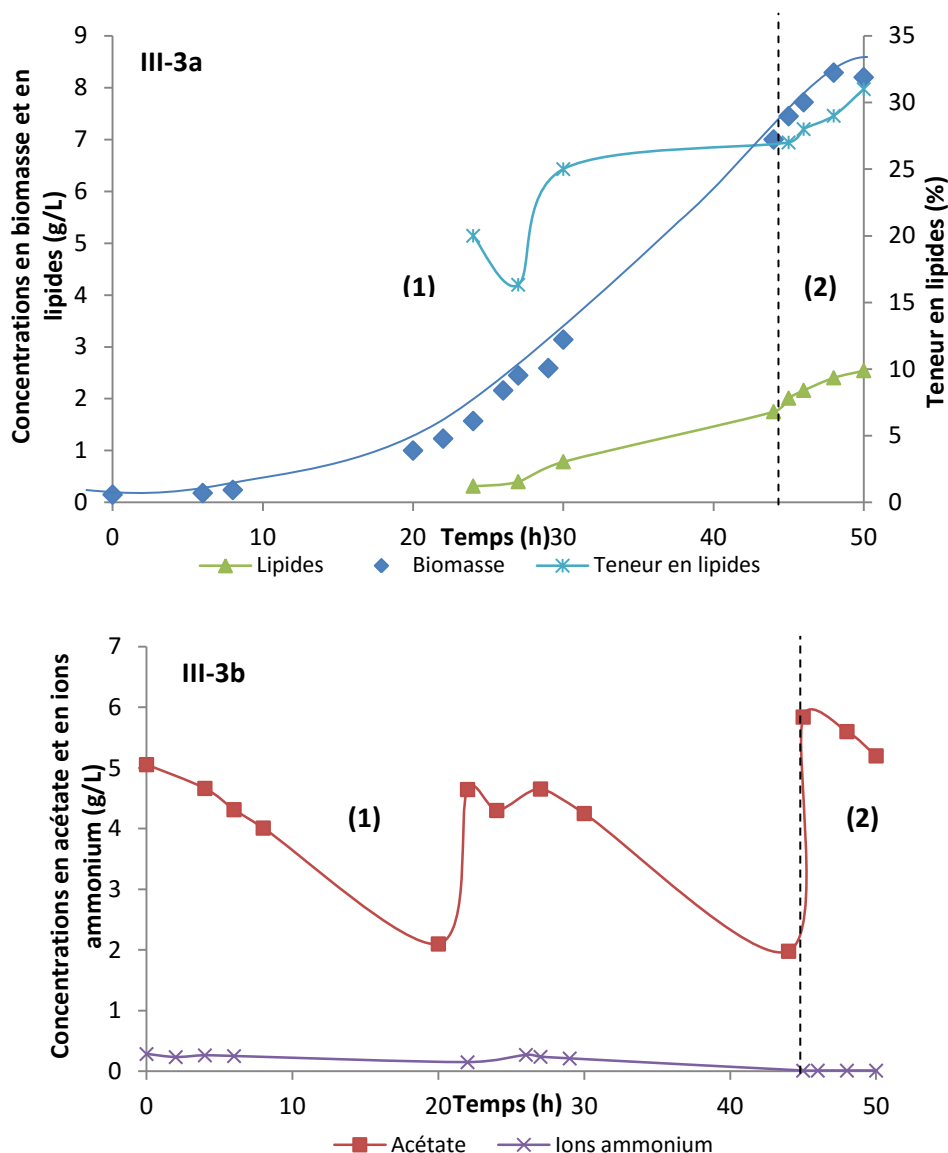
III-2b

**Figure III-2. Stratégies expérimentales en deux phases employées.**

(2a) Stratégie employant du glucose pour une phase de production de biomasse (phase 1) puis de l'acétate pour une phase d'accumulation de lipides (phase 2), (2b) L'acétate est utilisé comme unique source de carbone lors de la phase de production de biomasse (phase 1) et de production de lipides (phase 2).

## 2.2. Procédés de production de lipides sur acétate : Résultats initiaux

Une première étude exploratoire a été réalisée selon cette stratégie. Ces résultats préliminaires sont présentés dans la figure III-3.



**Figure III-3. Suivi de culture de *C. curvatus* en mode fed-batch séquentiel sur acétate.**

(3a) Suivi des concentrations en biomasse et en lipides et évolution de la teneur en lipides de la levure oléagineuse *C. curvatus*. (3b) Suivi des concentrations résiduelles d'acétate et d'ions ammonium. La culture se déroule en deux phases : croissance (phase 1) et accumulation de lipides (phase 2). Les ajouts des sources carbonées et azotées sont réalisés manuellement en fonction des concentrations résiduelles, le pH est de 6, la température de 30°C.

La préculture utilisée comme inoculum est réalisée à partir de glucose. La concentration en acétate dans le réacteur a été maintenue proche de 4 g/L par des ajouts manuels de substrat afin d'éviter toute limitation carbonée mais également toute perturbation de la culture causée par une

concentration trop élevée d'acétate dans le réacteur. Le pH du milieu de culture, fixé à 6 tout au long de la culture, est régulé grâce à un système de contrôle commande classique (KOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Bien que ces résultats valident la faisabilité de l'utilisation d'acétate comme unique source de carbone pour la production de biomasse et de lipides, ils montrent également les faiblesses liées à cette stratégie. Comparativement aux résultats obtenus par Christophe et al. (2012) employant du glucose et de l'acétate en tant que substrats, la production de biomasse et de lipides est considérablement réduite (Tableau III-1). La productivité en biomasse de cette culture, de l'ordre de 0,17 g/L de biomasse par heure est 2,75 fois inférieure à celle obtenue sur glucose (Tableau III-1). Ces résultats découlent notamment:

(i) d'une phase de latence importante, de l'ordre de 10 heures, constatée en début de culture. Cette phase correspond à une adaptation longue de la levure à l'acétate, pendant laquelle elle modifie son équipement enzymatique afin de pouvoir assimiler et utiliser ce nouveau substrat,

(ii) d'un taux de croissance faible (0,12 h<sup>-1</sup>) comparativement aux taux de croissance de cette souche obtenus lorsqu'elle est cultivée sur un substrat simple tel que le glucose ou le glycérol (Meesters et al., 1996),

(iii) d'une limitation par l'oxygène observée en fin de culture.

En fin de culture, la limitation en azote et l'augmentation du rapport C/N imposées aux levures conduisent à une augmentation de la teneur en lipides dans les microorganismes s'élevant à 31%. Cette teneur en lipides reste faible par rapport aux performances de cette souche obtenues sur d'autres substrats (Zhang et al., 2011). Elle s'explique principalement par la difficulté au cours de la deuxième phase à maintenir un rapport C/N optimal à l'accumulation de lipides avec le système d'alimentation choisi (ajouts manuels de substrats carbonés et azotés).



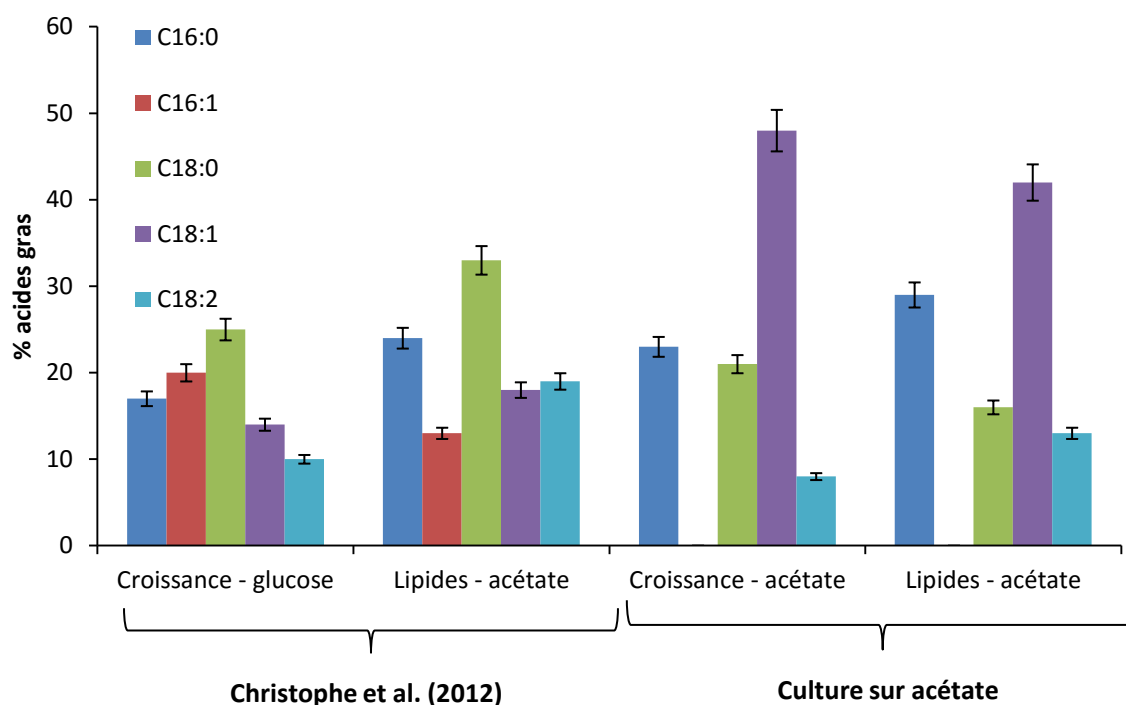
**Tableau III-1. Synthèse des résultats obtenus pour les deux stratégies envisagées.**

	Procédé impliquant plusieurs substrats (Christophe et al., 2012)		Procédé sur acétate	
	Phase 1 Croissance	Phase 2 Production de lipides	Phase 1 Croissance	Phase 2 Production de lipides
Substrat	Glucose	Acétate	Acétate	Acétate
Durée (h)	50		50	
Phase de latence (h)			10	
Taux de croissance $\mu$ (h <sup>-1</sup> )			0,12	
Biomasse finale (g/L)	10,5	13,5	7	8,2
Lipides (g/L)	1,7	6,9	1,8	2,5
Teneur en lipides (%)	16,0	50,9	25	31
Productivité biomasse (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,44	0,13	0,16	0,24
Productivité lipides (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,07	0,20	0,04	0,12
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,69	0,30	0,25	0,06
$Y_{CO_2/S}$ (g/g)	0,16	0,49	0,66	0,66
$Y_{L/S}$ (g/g)	0,11	0,15	0,02	0,05

### 2.3. Analyse de la composition en acides gras et prédiction de la qualité du biodiesel

Les caractéristiques définissant la qualité du biodiesel dépendent en grande partie de la composition en acides gras constitutifs des huiles. Avant d'envisager une mise à l'échelle industrielle de ce bioprocédé, la compatibilité des lipides produits doit être validée pour une utilisation comme précurseurs de biodiesel.

Les lipides extraits au cours des phases de croissance et d'accumulation de lipides des cultures de Christophe et al. (2012) et de la culture employant uniquement de l'acétate ont été transestérifiés et analysés par chromatographie gazeuse. Les profils d'acides gras en résultant sont présentés sur la figure III-4.



**Figure III- 4. Profils d'acides gras obtenus au terme de chacune des phases de croissance (sur glucose ou acétate) et d'accumulation de lipides sur acétate de la levure oléagineuse *C. curvatus*.**

Le procédé utilisant du glucose et de l'acétate conduit à une accumulation de triglycérides composés très majoritairement de 5 acides gras : l'acide palmitique (C16:0), l'acide palmitoléique (C16:1), l'acide stéarique (C18:0), l'acide oléique (C18:1) et l'acide linoléique (C18:2). Le procédé réalisé uniquement à partir d'acétate montre un profil d'acides gras radicalement différent. En effet, seuls 4 acides gras sont représentés : l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide oléique et l'acide linoléique. L'acide palmitoléique est absent quelle que soit la phase de culture considérée. C'est l'acide oléique qui cette fois est majoritaire. Ce résultat semble indiquer que le substrat carboné utilisé pendant la croissance a une influence significative sur la composition finale en lipides. D'autre part, une variation de la proportion de chacun de ces acides gras est observée selon la phase du procédé (croissance ou accumulation de lipides). La composition lipidique semble donc être également dépendante de l'état physiologique de la levure (croissance ou stress). Dans tous les cas, une augmentation de la proportion d'acide palmitique est observée au cours de la phase de production de lipides, ce qui est en accord avec le mécanisme de lipogenèse de la levure. L'acide palmitique reste le précurseur principal retrouvé pour la synthèse d'acides gras à plus longue chaîne. Cette variation des profils d'acides gras représente un véritable enjeu dans le cas où l'on cherche à produire des acides gras à longue chaîne polyinsaturée utilisables par exemple comme compléments alimentaires. Dans le cadre de ce projet, les investigations n'ont pas été davantage poursuivies sur ce sujet. Seule une validation de cette composition pour un usage comme biodiesel a été réalisée.

Les caractéristiques du biodiesel, en particulier l'indice de cétane, la viscosité cinématique, la densité, l'indice d'iode, la stabilité oxydative et la chaleur de combustion, sont fortement influencées par la composition en acides gras présents dans les lipides (Duarte et al., 2014; Knothe and Steidley, 2005; Pereyra-Irujo et al., 2009). Chacune des caractéristiques citées ci-dessus peut être prédite par des équations mathématiques proposées par Ramos et al. (2009) et Pereyra-Irujo et al. (2009) et présentées dans la partie « Etude bibliographique ». Les résultats de ces équations appliquées aux compositions en acides gras obtenues au cours des phases d'accumulation de lipides sur acétate sont présentés dans le tableau III-2.

**Tableau III-2 Prédictions des valeurs d'indice de cétane, de densité, de viscosité cinématique, de chaleur de combustion, de stabilité oxydative et d'indice d'iode.**

	<b>Christophe et al., 2012</b>	<b>Culture en deux phases</b>	<b>Norme européenne E14214</b>	<b>Norme américaine ASTM D 6751</b>
Indice de cétane	68	64,2	Minimum 51	Minimum 47
Densité (kg/m <sup>3</sup> )	836	866	860-890	
Viscosité cinématique (mm <sup>2</sup> /s)	4,1	4,3	3,5-5,0	1,9-6,0
Chaleur de combustion (kg/J)	39	40		
Indice d'iode (g <sub>I2</sub> /100g)	43	58	Maximum 120	
Stabilité oxydative (h)	24	20	Minimum 6	Minimum 3

Ces valeurs ont été calculées à partir des formules établies par Ramos et al. (2009) et Pereyra-Irujo et al. (2009) et des compositions en acides gras des lipides produits au cours des cultures.

L'indice de cétane évalue l'aptitude à l'auto-inflammation du carburant. Plus la durée entre l'injection du carburant et l'inflammation de celui-ci est courte, plus l'indice de cétane sera grand. Les normes européenne et américaine imposent que cet indice soit d'au minimum 51 et 47, ce qui est respecté dans le cas des biodiesels produits à partir des lipides issus des cultures de *C. curvatus* sur acétate.

Hormis la densité mesurée pour le biodiesel produit par Christophe et al. (2012), les valeurs présentées par les biodiesels produits à partir de lipides issus des cultures précédentes sont comprises dans la gamme autorisée par les normes européennes mais aussi américaines. L'indice d'iode et la stabilité oxydative des biodiesels issus des cultures de *C. curvatus* sur acétate montrent que les produits finaux sont stables et peu susceptibles d'être oxydés. La viscosité cinématique des biodiesels, aux environs de 4 mm<sup>2</sup>/s, reste comprise dans la gamme autorisée. Les esters méthylés

d'acides gras issus des lipides produits par *C. curvatus* cultivé sur acétate sont donc compatibles avec une utilisation dans le domaine des biocarburants.

## **2.4. Discussion autour de la stratégie envisagée**

Ces premiers résultats expérimentaux démontrent la faisabilité de cultiver, à partir d'acétate seul, la levure oléagineuse *Cryptococcus curvatus* et de synthétiser des lipides utilisables pour la production de biodiesel dont les caractéristiques répondent aux exigences imposées par les normes européennes et américaines.

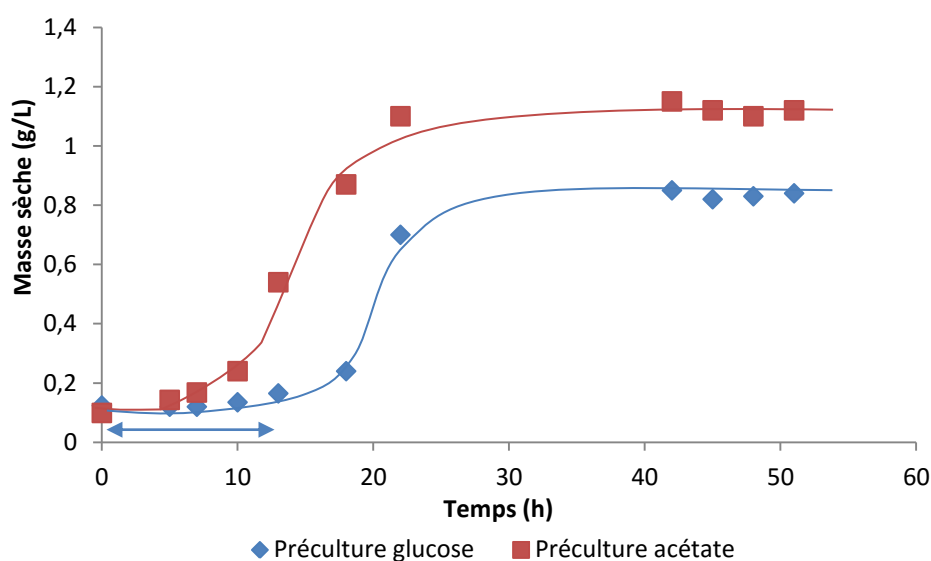
Cependant, pour rendre ce procédé compétitif, il va être nécessaire de lever les verrous préalablement décrits. L'amélioration des performances en termes de production de biomasse et de lipides va donc nécessiter une étude fine des paramètres qui influencent ces productions. La phase de croissance de *C. curvatus* sur acétate va dépendre en particulier des paramètres opératoires classiques de la culture (pH du milieu, conditions d'agitation et d'aération, etc) mais elle pourra également être améliorée grâce aux connaissances disponibles sur les voies d'assimilation du substrat ainsi que son devenir dans la cellule. Le mode d'alimentation en substrat et son contrôle peuvent aussi influencer sur la production de biomasse. Enfin, la concentration finale de lipides produits à partir d'acétate, qui suit la phase de production de biomasse, va dépendre : (i) de la concentration en biomasse initiale ; puisqu'une culture à haute densité cellulaire permettra d'obtenir une concentration en lipides tout aussi élevée, et (ii) des conditions de culture et en particulier du rapport C/N qui est un paramètre clé pour la production de lipides.

## **3. INFLUENCE DES PARAMETRES OPERATOIRES SUR LA PRODUCTION DE BIOMASSE ET DE LIPIDES PAR LA LEVURE OLEAGINEUSE *C. CURVATUS* A PARTIR D'ACETATE**

Cette seconde partie présente l'influence de différents paramètres de culture de *C. curvatus* sur la production de biomasse et de lipides à partir d'acétate. L'objectif est de déterminer les conditions de culture permettant de maximiser la production de biomasse et de lipides et de piloter de façon efficace ce procédé. Pour lever les verrous observés au cours de la culture précédente sur acétate en mode fed-batch (cinétique de croissance et teneur en lipides faibles), trois paramètres en particulier seront étudiés : (i) l'influence du pH du milieu de culture sur l'assimilation et la toxicité de l'acétate, (ii) le mode d'alimentation du substrat dans le réacteur, (iii) l'influence du rapport C/N sur la teneur en lipides finale.

### 3.1. Adaptation de la souche

Afin d'adapter les capacités métaboliques de la souche de *Cryptococcus* utilisée, les précultures ont été réalisées sur acétate afin de réduire la phase de latence préalablement observée lors du changement de substrat glucose/acétate. L'entraînement de la souche à ce substrat complexe permet de réduire la phase de latence de 12 heures initialement à environ 5 heures ; il a donc un impact significatif sur la phase de production de biomasse (figure III-5). Ces conditions de culture sont conservées dans la suite des expériences présentées.



**Figure III- 5. Suivi de culture en batch de *C. curvatus* sur acétate, préalablement cultivée sur acétate ou glucose.**

La concentration initiale d'acétate est de 5 g/L, le pH initial de 6 et la température de 30°C.

### 3.2. Influence du pH du milieu de culture sur l'assimilation de l'acétate

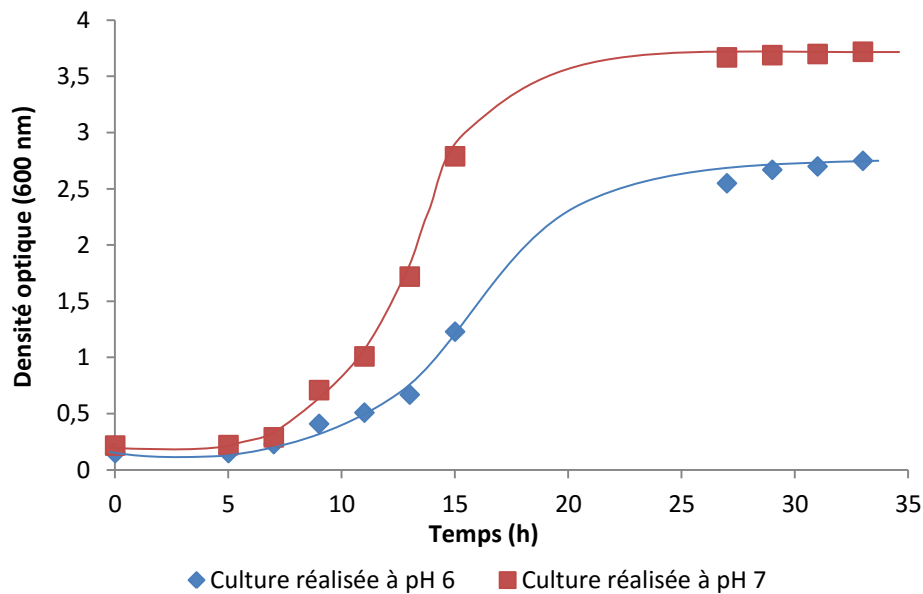
Le pH est un paramètre de culture ayant une influence capitale sur la croissance d'une souche de microorganisme si un acide carboxylique tel que l'acide acétique est utilisé comme source de carbone. En effet, le pH a un impact sur la forme (indissociée ou dissociée) de l'acide présent dans le milieu de culture en fonction de la constante de dissociation du couple acide/base utilisé. Les cultures de levure étant réalisées à des pH proches de la neutralité, la forme prédominante de l'acide alors présent dans le réacteur est la forme acétate puisque le pKa du couple acide acétique/acétate est de 4,75. Le pH possède également un rôle majeur dans le transport des acides à travers la membrane plasmique, puisque, en influençant la forme prédominante de l'acide présent dans le milieu, les modes d'entrée de ce type de molécule dans la cellule diffèrent en fonction de leur forme.

La partie « Etude bibliographique » présentée en début de ce manuscrit décrit que les formes indissociées de l'acide (l'acide acétique) diffusent librement à travers la membrane. C'est également cette forme qui semble être la plus toxique pour la cellule. Les formes dissociées (acétate) sont prises en charge par un système de transport actif. Par conséquent, le pH aura une influence sur la proportion de la forme dissociée acétate présente dans le milieu de culture et donc sur son assimilation dans la cellule.

Les cultures de levures réalisées à partir d'acétate ont préalablement été menées avec un pH régulé à 6. Ce pH est classiquement employé pour les cultures de *Cryptococcus* sur des substrats simples comme le glucose (Fei et al., 2011b), mais aussi sur des mix d'AGVs (Vajpeyi et Chandran, 2015). L'hypothèse est qu'en utilisant un pH plus élevé, la forme dissociée de l'acide sera davantage disponible dans le milieu et permettra une diminution de la toxicité de cette molécule. Une amélioration des cinétiques de croissance est donc attendue.

Afin de valider cette hypothèse, deux cultures en batch sur acétate ont été menées simultanément à pH 6 et à pH 7 (figure III-6 et tableau III-3). Les résultats indiquent une amélioration significative des taux de croissance maximaux lorsque la culture est réalisée à pH 7 puisque ce taux de croissance augmente d'un facteur 1,5 et concurrence les valeurs obtenues pour des levures cultivées sur des substrats simples tels que le glucose (Ochoa-Estopier et Guillouet, 2014). De même, la concentration en biomasse finale est plus élevée (1,3 fois supérieure) comparativement à la valeur obtenue à pH 6. Le rendement en biomasse est significativement plus élevé à pH neutre (0,47 g/g vs 0,40 g/g).

Ces résultats confirment donc que la variation du pH permet, en augmentant la concentration de la forme dissociée acétate, de limiter la toxicité de cette molécule au moment de son entrée dans la cellule. Il est concevable que l'énergie nécessaire au fonctionnement des pompes à protons utilisée par le microorganisme pour détoxifier son contenu intracellulaire soit réorientée vers le métabolisme général favorisant ainsi la croissance du microorganisme.



**Figure III-6. Suivi de culture en batch de la levure oléagineuse *C. curvatus* cultivée sur acétate, à pH 6 ou à pH 7.**

La concentration initiale d'acétate est de 5 g/L, la température de 30°C.

**Tableau III-3. Comparaison des cultures de levures *C. curvatus* réalisées à différents pH.**

Souche	<i>C. curvatus</i>	
Substrat	Acétate	
pH	6,0	7,0
Substrat consommé (g/L)	4,3	4,7
Concentration en biomasse (g/L)	1,71	2,23
Concentration en lipides finale (g/L)	0,26	0,40
Teneur en lipides (%)	15	18
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,40	0,47
$Y_{l/s}$ (g/g)	0,06	0,09
$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	0,19	0,28
G (h)	3,7	2,5

Dans le but de maximiser les performances de la souche à partir d'un acide dont la toxicité est forte, l'utilisation d'un pH neutre permet d'obtenir des taux de croissance et des rendements plus élevés qui se rapprochent des valeurs obtenues pour cette même souche lorsqu'elle est cultivée sur des substrats simples. L'équilibre acido-basique du couple acide acétique/acétate est donc une condition déterminante pour limiter la toxicité de l'acétate. Les données de Fei et ses collaborateurs (2011a) confirment ces résultats lors de cultures de la souche de *Cryptococcus albidus* menées sur une gamme de pH allant de 4,5 à 8. Une valeur de pH de 7 sera donc utilisée pour la suite de l'étude.

### 3.3. Contrôle du mode d'alimentation de la source de carbone au sein du réacteur

Le choix du mode d'alimentation du réacteur est un critère important pour la mise au point d'un système de production de biomasse efficace. Les cultures en mode fed-batch sont préconisées si le substrat employé s'avère toxique à forte concentration pour la souche, comme c'est le cas pour l'acétate. La culture préliminaire présentée dans le paragraphe 2.1. a été réalisée via un système d'apports séquentiels manuels qu'il est indispensable de mieux contrôler et d'automatiser. Différentes stratégies concernant les ajouts contrôlés de substrats sont présentées dans la littérature. L'alimentation peut être effectuée de façon automatisée après détermination des vitesses de consommation du substrat carboné (Fontanille et al., 2012) ou encore en fonction de l'évolution de la pression partielle en oxygène (Meesters et al., 1996; Cescut et al., 2014).

Dans le cas de l'utilisation d'une molécule acide comme substrat carboné, l'assimilation de cette molécule par la levure, ici l'acétate, entraîne une alcalinisation du milieu de culture qui doit être corrigée automatiquement par le système de régulation du pH du bioréacteur pour une maîtrise des conditions de culture. Le choix qui a été envisagé dans cette étude est de corrélérer la correction automatique du pH à l'ajout d'acétate. Ainsi, nous avons choisi de modifier le système de régulation du pH en remplaçant la solution d'acide sulfurique classiquement utilisée par une solution d'acétate contenant également les autres nutriments du milieu ainsi que la source d'azote.

L'intérêt de ce système est de pouvoir automatiquement ajouter l'acétate au milieu via ce système de contrôle-commande. L'acétate sera alors disponible pour la levure dès qu'une partie du substrat aura été consommée. Ce système permet de maintenir des concentrations de carbone et d'azote relativement stables dans le réacteur. Ce dernier point est notamment recherché concernant l'acétate puisqu'au-delà de 5 g/L, les effets de cette molécule sont délétères pour la cellule (Fontanille et al., 2012; Yahara et al., 2007; Fei et al., 2011). La possibilité de moduler les concentrations de la source d'azote dans la bouteille d'alimentation permet également :

- (i) d'apporter l'azote de façon non limitante à la culture afin de favoriser la production de biomasse,
- (ii) de pouvoir imposer une limitation azotée en réduisant la concentration de la source d'azote, sans carencer la culture puisqu'une quantité minimale d'azote est apportée tout au long de la culture.

Le choix de n'utiliser qu'une solution d'alimentation plutôt que de dissocier l'apport carboné et l'apport azoté comme cela est fréquemment rencontré dans la littérature est volontaire. Bien que cela complexifie la mise au point du système, ce choix est justifié par l'objectif final qui sera de



coupler cette production de lipides avec un compartiment anaérobie. Il est envisagé de n'utiliser qu'une solution d'alimentation contenant le surnageant de fermentation du premier compartiment.

Ce choix a donc nécessité une mise au point importante des débits d'alimentation (temps de rotation de la pompe et diamètre des tuyaux d'alimentation), des concentrations de solutions d'alimentation et du paramétrage de la zone morte autour du point de consigne de la valeur pH qu'il est difficile de représenter ici car elle repose principalement sur des aspects expérimentaux. Cette mise au point a cependant permis de définir le volume nécessaire à ajouter à chaque rotation de la pompe de 1 à 5 mL, en fonction de l'évolution de la culture, qui est déclenchée pour une variation de pH de 0,05 unité afin de maintenir les concentrations souhaitées dans le réacteur.

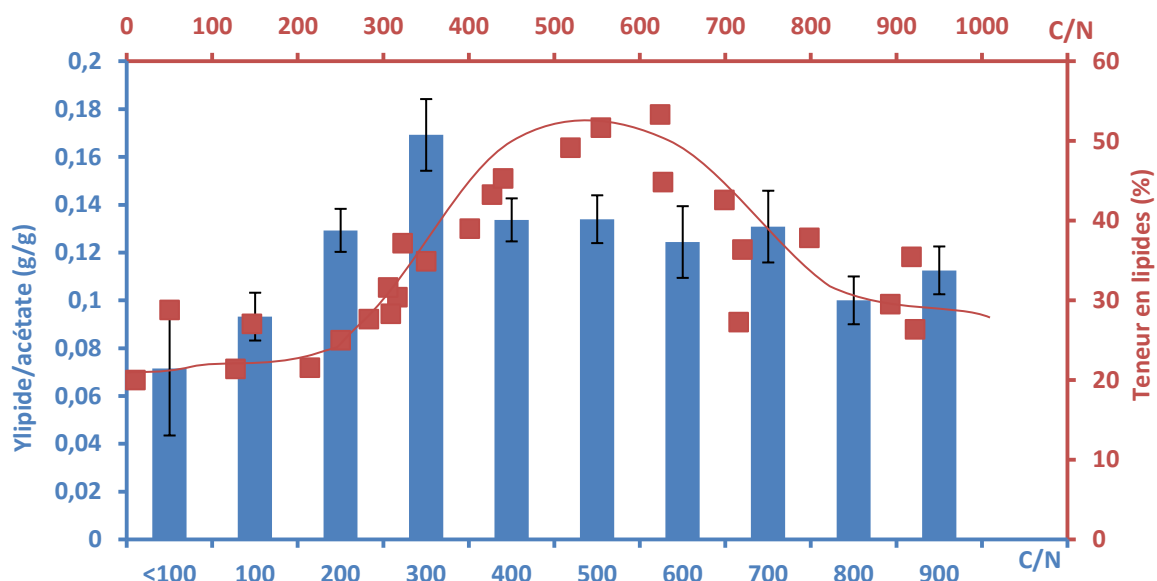
### **3.4. Influence du rapport Carbone/Azote (C/N) sur la production de lipides**

Afin de maximiser la production de lipides à partir d'acétate, la détermination du rapport C/N du milieu le plus favorable à l'accumulation de lipides est un paramètre essentiel à connaître. Dans les conditions de limitation par l'azote, un shunt métabolique est observé chez la levure, conduisant à un ralentissement de la croissance au début de la lipogénèse. Le flux de carbone, dirigé pendant la croissance vers la synthèse de protéines, glucides, lipides, acides nucléiques et biomasse catalytique, est alors principalement détourné vers la production de lipides lorsqu'une limitation azotée intervient, ce qui augmente la teneur en lipides des levures. Plusieurs études se sont concentrées sur la détermination d'un rapport C/N favorable à la production de lipides. Ykema et ses collaborateurs (1988) ont suggéré qu'un rapport C/N de 70 permettait de produire une teneur en lipides finale de 50% chez la souche *Apiotrichum curvatum* cultivée sur du lactosérum. Un milieu de culture utilisant de l'acétate comme source de carbone et présentant un rapport C/N de 50 entraîne chez *Yarrowia lipolytica* l'accumulation de 41% de lipides (Fontanille et al., 2012). Matsakas et ses collaborateurs (2014) ont quant à eux déterminé que des rapports C/N supérieurs à 100 induisaient une accumulation de lipides chez la levure *L. starkeyi* cultivée sur un mélange de sucres.

Si la teneur en lipides est un critère essentiel afin de déterminer si le mode de culture employé est performant, le rendement en lipides ( $Y_{L/S}$ ) est également un paramètre important à prendre en considération. En effet, dans l'optique d'une valorisation de coproduits de fermentation, il est nécessaire d'avoir un procédé permettant de convertir le plus efficacement possible le substrat en composés d'intérêt.

Afin d'affiner le rapport C/N permettant de maximiser ces deux derniers paramètres, les teneurs en lipides et les rendements ont été mesurés et reportés en fonction des C/N instantanés dans le réacteur au cours de plusieurs cultures en fed-batch de *C. curvatus* sur acétate. Ces valeurs ont été

déterminées à plusieurs temps de culture au cours desquelles le rapport C/N était modifié volontairement. Ces données sont reportées sur la figure III-7.



**Figure III-7. Influence du rapport C/N sur la teneur et le rendement en lipides de *C. curvatus* cultivée sur acétate.**

Les rendements en lipides indiqués sur cette figure sont des moyennes de rendements obtenus sur des gammes de rapports C/N (0-100 ; 100-200 ; etc).

Les résultats montrent que les distributions des teneurs et des rendements en lipides sont décorréliées : les valeurs maximales de chacun de ces paramètres ne sont pas atteintes pour un même rapport C/N. Par conséquent, une teneur en lipide élevée n'est pas un gage de conversion efficace du substrat en lipides (et inversement).

La distribution des teneurs en lipides s'articule selon une courbe en cloche. Dans des conditions où l'azote n'est pas limitant (C/N 10), les teneurs en lipides obtenues sont proches de 20%. Il n'y a pas dans ce cas d'accumulation de lipides. Cette valeur représente une teneur en lipide basale présente chez les microorganismes oléagineux. Le rendement lipidique reste très faible, de l'ordre de  $0,06 \pm 0,03$  g/g. Assez logiquement, c'est dans ces conditions que le rendement en biomasse est le plus élevé.

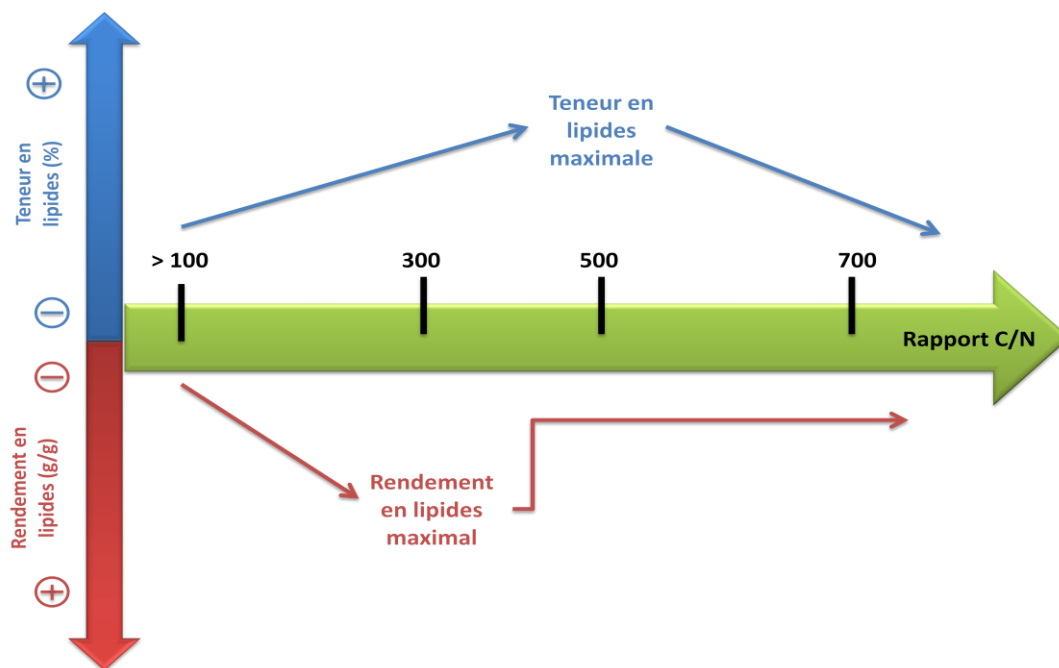
Les teneurs en lipides augmentent lorsque le rapport C/N dans le milieu dépasse 200. Les teneurs maximales (environ 50%) sont obtenues lorsque le milieu de culture présente un rapport C/N compris entre 500 et 600. Enfin, lorsque les rapports C/N sont très élevés (au-delà de 700), les teneurs en lipides tendent à diminuer.

A l'inverse ces valeurs instantanées montrent que le rendement de production de lipides à partir d'acétate est maximal ( $0,17 \pm 0,02$  g/g) vers un C/N compris entre 200 et 400. Pour des valeurs supérieures (400 à 700), les rendements en lipides correspondant diminuent, variant entre  $0,12 \pm 0,01$  et  $0,13 \pm 0,01$  g/g. Ceci signifie que, même si des concentrations importantes de lipides sont obtenues à des rapports C/N élevés, le métabolisme semble moins efficace pour la production de lipides et se détourne alors vers la production d'autres types de molécules (oses neutres,  $\text{CO}_2$ ). Des rendements en lipides encore plus faibles sont obtenus pour des rapports C/N au-delà de 700, et restent compris entre  $0,10 \pm 0,01$  et  $0,11 \pm 0,01$  g/g. Deux hypothèses peuvent expliquer ce cas de figure :

- (i) Une reconsommation des lipides a lieu lorsque le rapport C/N tend vers l'infini. Ce phénomène correspond au turn-over des lipides et a déjà été observé chez *C. curvatus* cultivée sur AGVs (Xu et al., 2014), *Trichosporon coremiiforme* et *Trichosporon dermatis* cultivées sur eaux usées (Chen et al., 2012; Peng et al., 2013),
- (ii) Des C/N élevés ne sont pas compatibles avec une accumulation de lipides importante, la concentration en acétate correspondante pouvant être toxique dans ce cas-là. Un mécanisme de maintenance pourrait donc se mettre en place au détriment de la production de lipides.

Ces résultats basés sur des informations instantanées au cours de plusieurs cultures semblent indiquer que deux stratégies pour la production de lipides à partir d'acétate se distinguent et sont résumées dans la figure III-8.

- (i) Soit la stratégie consiste à privilégier le fait d'avoir une teneur en lipides élevée (>50%) mais présenter en parallèle un rendement en lipides moyen se traduisant par une utilisation partielle du substrat pour la production de lipides,
- (ii) Soit la stratégie s'attache à maximiser la conversion du substrat en composés d'intérêt, même si les teneurs en lipides correspondantes ne sont pas les valeurs maximales possibles.



**Figure III-8. Influence du rapport C/N sur la teneur en lipides et le rendement en lipides.**

Le choix de la stratégie employée va principalement dépendre du coût du substrat et de la valeur intrinsèque du produit même s'il est généralement idéal de s'approcher d'une valeur intermédiaire.

A la suite de ces résultats, une analyse plus fine de l'influence du rapport C/N qui sera maintenu à des valeurs représentatives de 300, 500 et 900, est présentée dans la partie suivante.

### **3.5. Bilan de l'influence des paramètres opératoires sur la production de biomasse et de lipides**

En conclusion, ces premières avancées concernant les conditions susceptibles d'améliorer la production de biomasse et de lipides par la levure oléagineuse *Cryptococcus curvatus* cultivée sur acétate mettent en évidence que :

- (i) une augmentation du pH permet de réduire la toxicité de l'acide acétique en favorisant l'assimilation de la forme acétate et conduit à une augmentation du taux de croissance maximal de la souche et du rendement de production de biomasse,
- (ii) une adaptation de la souche de levure à l'acétate permet de réduire significativement la phase de latence observée en début de culture,

(iii) la connaissance de l'assimilation de l'acétate dans la cellule permet d'imaginer un système d'apport du substrat pouvant éviter une limitation carbonée qui permet d'alimenter le réacteur de façon automatisée grâce au système de régulation pH,

(iv) ce système de régulation pH permet aussi de modifier les concentrations en substrats carbonés et azotés et donc de jouer sur le métabolisme de la levure.

(v) le rapport C/N du milieu a un impact sur la teneur et le rendement en lipides finaux,

(vi) la production de biomasse est favorisée lorsque le rapport C/N du milieu est faible (de l'ordre de 10) puisqu'on obtient, pour ces valeurs de C/N, les rendements en biomasse les plus élevés,

(vii) un rapport C/N évoluant entre 400 et 600 semble être celui permettant l'accumulation de lipides la plus importante (de l'ordre de 50%) alors qu'un rapport C/N compris entre 200 et 400 permet d'obtenir les meilleurs rendements en lipides.

Est présenté à la suite de ces résultats un article intitulé *Improvement and modeling of culture parameters to enhance biomass and lipid production by the oleaginous yeast Cryptococcus curvatus grown on acetate*, publié dans Bioresource Technology en septembre 2015. Cet article reprend les principaux points d'amélioration de la stratégie de culture présentés dans ce chapitre (augmentation du pH de culture, couplage de l'apport du milieu d'alimentation à la régulation pH). A la suite de ces premières observations, une première culture en fed-batch de la levure *C. curvatus* sur acétate a été menée dans le but de maximiser la concentration en biomasse finale grâce aux points d'amélioration identifiés. Cette culture a montré que les modifications apportées au système permettent d'accumuler jusqu'à 80 g/L de biomasse en 60 heures de culture. Ce travail a également permis de mettre au point un modèle de croissance de la souche sur acétate. Celui-ci sera davantage détaillé dans le chapitre IV.

Dans un deuxième temps, afin d'identifier le rapport C/N le plus favorable à la production de lipides (parmi ceux identifiés de façon préliminaire dans la partie 3.4), un système permettant le maintien de trois rapports C/N (300, 500 et 900) stables au cours du temps associés à une limitation en azote a été mis au point lors d'une culture en fed-batch. Ce système permet de discuter sur l'influence de la valeur du rapport C/N sur l'accumulation et les rendements en lipides obtenus lors de cultures de *C. curvatus* réalisées sur acétate.

A la suite de cet article, nous discuterons des résultats les plus marquants obtenus au cours de ce travail.

## 4. IMPROVEMENT AND MODELLING OF CULTURE PARAMETERS TO ENHANCE BIOMASS AND LIPID PRODUCTION BY THE OLEAGINOUS YEAST *CRYPTOCOCCUS CURVATUS* GROWN ON ACETATE

Vanessa Bélignon<sup>a</sup>, Laurent Poughon<sup>a,b</sup>, Gwendoline Christophe<sup>a,b</sup>, André Lebert<sup>a,b</sup>, Christian Larroche<sup>a,b</sup>, Pierre Fontanille<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Université Blaise Pascal, Institut Pascal, UMR CNRS 6602, TSA 60026, CS 60026, F-63178 AUBIERE cedex, France

<sup>b</sup> Université Blaise Pascal, LABEX IMobS3, TSA 60026, CS 60026, F-63178 AUBIERE cedex, France

\*Corresponding author. Email address: Pierre.FONTANILLE@univ-bpclermont.fr

**Abstract:** The improvement of culture parameters for lipid production from acetate as carbon source was investigated using the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. A new pH regulation system dispensing acetate was developed for fed-batch culture and allowed obtaining nearly 80 g/L biomass within 60 hours with a maximal growth rate of 0.28 h<sup>-1</sup>. A biological model was developed from experimental data. The influence of three C/N ratios of 300, 500 and 900 were tested during a multi-phases process on lipid accumulation. The C/N ratio of 300 was reported to be the most suitable for lipid storage. No significant increase of lipids content was obtained with higher value. A maximal content of 60% DCW of lipid was obtained. The determination of fatty acids profiles of the microbial oils has confirmed that the valorization of acetate by microbial oils production was a promising perspective.

**Keywords:** volatile fatty acids – *Cryptococcus curvatus* – microbial lipids – bioconversion – biodiesel

### 4.1. Introduction

Concerns on the depletion of fossil fuels and global warming led to the search of renewable and environment-friendly energy sources. Biodiesel is attracting more and more attention due to its potentiality to replace petroleum-based diesel. It can be produced from different sources such as vegetable and animal oils or fats and wastes of cooking oils (Ghaly et al., 2010). However, biodiesel derived from oilseeds or animal fats supply only a small part of the transport fuel demand (Chisti, 2007). Another problem rising from biodiesel production is the use of edible vegetable oils, leading to the significant increase of raw material price. New raw materials have to be found and have to respond to these characteristics: (i) do present superior environmental benefits over the fossil fuels replaced, (ii) are sufficiently produced to meet the increasing energetic demand, (iii) provide a net energy gain over the energy sources used to produce it (Meng et al., 2009).

Oleaginous microorganisms are able to accumulate lipids up to more than 20% of their dry mass, under particular culture conditions notably nitrogen (Meesters et al., 1996), phosphate or sulfate (Wu et al., 2011) limitations. Lipids are stored as triacylglycerols contained inside vesicles. These lipid droplets, also referred to as single cell oils, have a fatty acids profile similar with those of vegetable oils currently used in the biodiesel domain. Therefore, microbial oils are considered as potential candidate as alternative of vegetable oils. Moreover, microorganisms present several advantages compared to plant: (i) higher growth rates, (ii) lower volume surface requirements, (iii) high biomass and lipid productivities.

The bioconversion of simple sugars into microbial lipids by oleaginous yeasts is a well-known process. In the literature, many studies reported high values of lipid content and yield obtained from cultures using glucose as carbon source. For example, Cescut et al. (2014) reported a lipid content of 64% and a lipid yield of 0.224 g/g for a fed-batch culture of *R. glutinis*. Despite being efficiently transformed into lipids, glucose is considered as an expensive substrate (\$500 per ton) and represents 60% of the total production cost in a typical fermentation process (Fei et al., 2011b). This high cost may prevent the industrialization of this bioprocess. Therefore, low-cost substrates should be considered. Recent studies deal with oleaginous strains able to produce lipids from agro-industrial wastes, such as dried sweet sorghum (Matsakas et al., 2014) and organic wastes from the brewery industry (Ryu et al., 2013).

More and more studies deal with the use of VFAs as carbon source for lipids production. These VFAs constitute a very interesting raw material because they can be produced from a variety of agro-alimentary wastes (Pessiot et al., 2012) and lignocellulosic biomass fermentation. Fei et al. (2011b) have evaluated the cost of one ton of VFAs produced from foodwastes to \$30, making it an attractive substrate for lipid production. Table III-4 references recent studies which focused on yeast cultivations and lipid production on VFAs. Preliminary studies have demonstrated the ability of *C. curvatus* to grow and accumulate triacylglycerides using volatile fatty acids as carbon source (Christophe et al., 2012). Fontanille et al. (2012) also tested acetate, propionate and butyrate as carbon sources for lipid production with the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*.

However the use of organic acids remains more complex than simple sugars due to their toxicity and their difficult assimilation for oleaginous strains. Fontanille et al. (2012), Fei et al. (2011b) and Yahara et al. (2007) have observed an inhibitory effect on the growth of yeast when initial VFAs concentration was higher than 5 g/L. These organic acids which are weak acids have an important effect on cell physiology depending on their degree of dissociation. The pH becomes a key parameter for the development and control of such a process.

This work is a part of the development of a biorefinery project aiming a full use of byproducts of hydrogen production process by dark fermentation of lignocellulosic wastes i.e. acetate, propionate and butyrate. Acetate, being predominantly present in the VFA mixtures obtained, has been chosen as a model substrate in this study. The aim of this work is to present the improvement and the modelling of a lipid production process using *C. curvatus* grown on acetate, using an appropriate fed batch protocol to produce high concentration of biomass and lipids.



**Tableau III-4. Comparison of lipid content and biomass, lipid and CO<sub>2</sub> yields obtained from yeast cultures grown on various substrates.**

Strain	Culture mode	Culture conditions	Carbon source	Lipids (wt. %)	Lipid (g/L)	Y <sub>X/S</sub> (g/g)	Y <sub>L/S</sub> (g/g)	Y <sub>CO<sub>2</sub>/S</sub> (g/g)	Reference
<i>R. glutinis</i>	Fed-batch	N limitation	Glucose	64	70.4		0.22		Cescut et al., 2014
<i>Y. lipolytica</i>	Fed-batch	N limitation	Glucose/Acetate	40.69	12.4	0.32	0.13		Fontanille et al., 2012
<i>L. starkeyi</i>	Batch	C/N 190	Glucose/Fructose	47.3	5.81	0.28	0.13		Matsakas et al., 2014
<i>L. starkeyi</i>	Fed-batch		Glucose/Xylose	46.9	36.8	0.32	0.15		Anschau et al., 2014
<i>R. toruloides</i>	Batch	N and P limitations	Glycerol	41.1	7.6	0.33	0.22		Yang et al., 2014
<i>R. toruloides</i>	Batch	N and S limitations	Glucose	56.8	10.1		0.19		Wu et al., 2011
<i>C. albidus</i>	Batch	N limitation	VFAs	25.1	0.65		0.12		Fei et al., 2011a
<i>C. albidus</i>	Batch	N limitation	Acetate	25.8	0.74		0.12		Fei et al., 2011a
<i>C. albidus</i>	Batch	N limitation	VFAs	28.3	0.32		0.05		Vajpeyi and Chandran, 2015
<i>C. curvatus</i>	Batch	C/N 35 :1	Spent yeast	37.7	19	0.23	0.22		Ryu et al., 2013
<i>C. curvatus</i>	Batch	N limitation	Acetate	37.2	1.04				Zheng et al., 2012
<i>C. curvatus</i>	Batch	N limitation	VFAs/Mannitol	48.30	1.30				Xu et al., 2014
<i>C. curvatus</i>	Fed-batch	C/N 49/1	Acetate	53.8	37				Chi et al., 2011
<i>C. curvatus</i>	Fed-batch		VFAs	60.5	1.35	0.26	0.15		Xu et al., 2015
<i>C. curvatus</i>	Fed-batch	N limitation	Acetate	50.89	6.6	0.30	0.15	0.49	Christophe et al., 2012
<i>C. curvatus</i>	Fed-batch	C/N close to 5	Acetate	10-19		0.47	0.07	0.97	Section 4.3.2.2.
<i>C. curvatus</i>	Fed-batch	Growth phase <sup>a</sup>	Acetate	20	4.4	0.45	0.09	0.65	Section 4.3.3.1.
<i>C. curvatus</i>	Fed-batch	C/N 300 <sup>b</sup>	Acetate	53	25	0.42	0.23	0.68	Section 4.3.3.1.
<i>C. curvatus</i>	Fed-batch	C/N 500 <sup>c</sup>	Acetate	56.7	26.4	0.39	0.19	0.70	Section 4.3.3.1.
<i>C. curvatus</i>	Fed-batch	C/N 900 <sup>d</sup>	Acetate	60	28.4	0.36	0.18	0.71	Section 4.3.3.1.

Y<sub>X/S</sub> : biomass yield – Y<sub>L/S</sub> : lipid yield – Y<sub>CO<sub>2</sub>/S</sub>: CO<sub>2</sub> yield. N: nitrogen – P: phosphor – S: sulfur. Biomass, lipids and CO<sub>2</sub> yields on acetate were calculated from the experimental data presented in Figure 3. <sup>a</sup> Yields were calculated with the initial and the final values of the period comprised between 0 and 48 hours of culture. <sup>b</sup> Yields were calculated with the initial and the final values of the period comprised between 0 and 70 hours of culture, during which the C/N ratio was maintained close to 300. <sup>c</sup> Yields were calculated with the initial and the final values of the period comprised between 0 and 77 hours of culture during which the C/N ratio was maintained close to 500. <sup>d</sup> Yields were calculated with the initial and the final values of the period comprised between 0 and the end of the culture, during which the C/N ratio was maintained close to 900.

## 4.2. Materials and methods

### 4.2.1. Culture preparation

#### 4.2.1.1. Strain

The yeast strain used in the present study was *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. It was maintained on Potato Dextrose Agar plate at 25°C and sub-cultured every week.

#### 4.2.1.2. Medium culture

The medium used for preculture, batch and fed-batch culture in bioreactor contained (g/L): acetate, 5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 3; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.04; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.016; MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.0038; CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.0005; CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.0009; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.00006; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.023; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.003; yeast extract, 0.1. The medium was steam autoclaved at 121°C and 103.4 kPa (15 psi) for a batch time of 20 minutes. To avoid any precipitation in the culture medium, the pH was adjusted to 4.5 before sterilization with orthophosphoric acid and adjusted to 7 after sterilization with a KOH solution.

During the fed-batch culture, two feed medium were used as acidic solution for pH regulation. A first feed medium was used for the biomass production phase, exhibiting a C/N ratio of 10. Its composition was similar to the culture medium previously described except for acetate and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrations set respectively at 700 and 133 g/L. In the second feed medium used for lipid production phase, acetate concentration was set at 700 g/L, no (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was present.

During the culture, a vitamins solution sterilized by filtration (0.22 µm) and composed of (g/L): d-biotine 0.05; panthotenic acid 1; nicotinic acid 1; vitamin B1 hydrochloride 1; PABA 0.2; vitamin B6 hydrochloride 1; myoinositol 25, was added (1 ‰) to the bioreactor every time when the biomass concentration increased by 10 g/L, preventing a limitation of one of the components previously cited.

#### 4.2.1.3. Inoculum preparation

The inoculum was prepared as follows. 400 mL (for fed-batch culture) or 50 mL (for batch culture) of the pre-culture medium was transferred into a 2L- (for fed-batch culture) or into a 250 mL- Erlenmeyer flasks (for batch culture). The medium was inoculated with the colonies picked out from the agar plate and incubated for 30 hours at 30°C. The incubation took place in a rotary shaker with the agitation speed set at 100 rpm. The 400 mL broth of *C. curvatus* was used to inoculate a 7L

bioreactor (GPC C-BIO, La Rochelle, France) with a working volume of 5L. The 50 mL broth was used to inoculate a pair of 750 mL bioreactors (INFORS HT, Switzerland).

#### **4.2.2. Submerged fermentations**

##### **4.2.2.1. pH-stat batch culture in fermentor**

Two identical bioreactors (750 mL total volume) that could be operated at the same time in different experimental conditions were used (INFORS HT, Switzerland). The working volume was 500 mL. Agitation was maintained at 500 rpm and aeration at 1 L/min. The temperature was maintained at 30°C. The pH of the two reactors were respectively controlled at 6.0 and 7.0. A solution of 5N KOH was first used to adjust the pH of the medium to the desired setpoint. Then, during the culture, the setpoint was maintained thanks to a 4N sulfuric acid solution ( $H_2SO_4$ ). Initial acetate concentration was 5 g/L.

##### **4.2.2.2. Fed-batch culture for biomass production**

Yeast culture was performed in an aerated and stirred 7L tank bioreactor (GPC-BIO, La Rochelle, France) with a working volume of 5L. The temperature was maintained at 30°C and the pH was controlled at 7.0 by automatic addition of a feed medium. Initial agitation and aeration conditions were set at 400 rpm and 0.5 L/min respectively and increased to a maximal value of 1000 rpm and 3 L/min. Oxygen consumption and carbon dioxide production rates were measured by a gas analyser (ZRE gas analyser, Fuji Electric, Japan). Online data process parameters was done using an acquisition software (C-BIO, La Rochelle, France).

Initial acetate concentration was 5 g/L. The pH was maintained to 7.0 by automatically addition of concentrated medium containing acetic acid as soon as pH value took a value exceeding of 0.05 the setpoint value. The composition of this feed medium was detailed in section 4.2.1.2.

##### **4.2.2.3. Fed-batch culture for lipid production**

The first part of the process was a biomass production phase under the conditions previously described. Then, once ammonium was totally exhausted, the feed medium was replaced by an ammonium-free solution which composition was given in section 4.2.1.2. This step was run in order to induce lipid accumulation. During this phase, pH was maintained at 7.0 by automatic control using feed medium. Agitation and aeration conditions were respectively set to 1000 rpm and 2 L/min. At the end of the growth phase, the C/N ratio was adjusted by the addition of pure acetate after determining the residual ammonium sulphate concentration in the reactor (Patton and Crouch,

1977). Then, the required C/N ratio (300, 500 or 900) was maintained thanks to the feed medium. Acetate was the carbon source, the yeast extract brought the nitrogen source but also minerals and vitamins.

#### **4.2.3. Analytical methods**

##### **4.2.3.1. Determination of dry cell weight and turbidity**

Turbidity was determined at 600 nm using a spectrophotometer (Safas Monaco, UV mc<sup>2</sup>).

For dry cell weight determination, 5 mL of broth culture were used. Wet cells were recovered by centrifugation at 10 000g for 10 minutes. Cell dry weight was obtained by drying in an oven at 110°C to constant weight in pre-weighed tubes.

##### **4.2.3.2. Determination of acetate concentrations**

The concentration of acetate was determined in filtered aliquots of the culture by an HPLC apparatus (Agilent 100, Agilent Technology) fitted with two columns (Rezex ROA 300x7.8 nm, Phenomenex, USA) mounted in serial assembly in an oven (50°C) with a refractometer as detector. The mobile phase consisted of 2 mM sulfuric acid in ultra-pure water pumped at 0.7 mL/min and 70 bars (7000 kPa). For the analysis, 2 mL of sample were mixed with 250 µL of Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O (0.3 M) and 250 µL of ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (5% w/v). The mixture was centrifuged at 10 000 g for 5 minutes. The supernatant was filtered through a 0.2 µm cellulose acetate filter and 10 µL was injected in the HPLC apparatus.

##### **4.2.3.3. Measurement of ammonium nitrogen**

Ammonium concentration was determined by the colorimetric method of Patton and Crouch, 1977. One hundred microliters of sample were mixed with 500 µL alkaline hypochlorite, 500 µL of phenol nitroprusside and 3 mL of distilled water. The mixture was incubated at 25°C for one hour and the absorbance was recorded at 570 nm. A calibration curve was done using (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solutions (0-80 mg N/L).

##### **4.2.3.4. Measurement of monosaccharide concentration**

Monosaccharide concentration was determined by colorimetric method (Monsigny et al., 1988). Two hundred microliters of sample were mixed with 200 µL resorcinol and 1 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The mixture was incubated at 90°C for 30 minutes and left for cooling in the dark for 30 minutes. Each sample was diluted with 1.4 mL H<sub>2</sub>O and the absorbance was recorded at 450 nm. A calibration curve was prepared using glucose solution (0-0.3 g/L). All the colorimetric measurements were performed in triplicate.

#### 4.2.3.5. Cellular lipids extraction and analysis of fatty acid composition

Culture samples were disrupted at 2500 bar using a bench-top cell disruptor (Constant System Limited, Low March, Daventry NN11 4SD, United Kingdom). 0.5 mL of the milling were mixed with 4 mL of chloroform, 2 mL of methanol and 1 mL of water. After a 10 min-centrifugation step at 2,000 g, the organic phase was recovered in pre-weighed tubes. Lipids were obtained after evaporation of the solvent in a speed-vacuum at 40°C until constant weight. Lipids were then conserved in chloroform at -20°C. All the extraction were repeated 3 times.

The fatty acids profile of the lipid was determined by saponification followed by methylation for conversion of fatty acids to fatty acid methyl esters (FAMES) according to the method of Morrison and Smith (1964). Eight hundred microliters of MeOH/BF<sub>3</sub> (14%) were added to 100 µL of sample and put in a water bath during 15 minutes at 100°C. After the addition of 1.5 mL of water and 750 µL of hexane containing an internal standard (heptadecane, 1% (v/v)), 1 µL was injected in a gas chromatograph (HP6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) fitted with an apolar supelco SPB-5 (Supelco Inc., Bellefonte, PA) capillary column (30 x 0.32 mm i.d., film thickness 0.25 µm) and a flame ionization detector. The oven was programmed to raise its temperature from 170°C to 220°C at a 3°C/min rate and at the end kept for 3 minutes at 220°C. Nitrogen was the carrier gas at 0.80 mL/min. The split ratio was 1:50 (v/v). The injector and the detector temperatures were set at 250 and 280°C, respectively. The identification of methyl esters was done by comparing the retention times with known standards.

#### 4.2.4. Numerical methods

##### 4.2.4.1. Growth model

The growth was assumed to be described by a single mass balanced stoichiometric equation:



Equation (1) was a three degrees of freedom equation requiring three independent experimental data to be solved, for a known CHON composition of biomass and lipid. It had to be noticed that the experimental dry cell weight measured was the sum of biomass (X) and lipids.

This stoichiometric equation was associated to the Monod kinetic law given by the equation (2):

$$R_X = \mu_{\max} \frac{S_{\text{Ac}}}{K_S + S_{\text{Ac}}} \frac{S_N}{K_{SN} + S_N} \frac{S_{\text{O}_2}}{K_{S\text{O}_2} + S_{\text{O}_2}} X \quad \text{Equation III- 2}$$

Where  $R_x$  was the biomass production rate,  $\mu_{\max}$  the maximal growth rate,  $S_{Ac}$  the substrate concentration,  $S_N$  the ammonium concentration,  $S_{O_2}$  the oxygen concentration,  $K_s$ ,  $K_{S_{O_2}}$  and  $K_{S_N}$  being the “half velocity” constants of respectively  $S_{Ac}$ ,  $S_{O_2}$  and  $S_N$ .

According to equation (2), the production rate  $R_i$  of the compounds involved in the growth was calculated as:

$$R_i = \frac{1}{Y_{x/i}} R_x \quad \text{Equation III- 3}$$

with  $Y_{x/i}$  the mass yield of each compound  $i$  ( $Y_{x/i} > 0$  for production and  $< 0$  for substrates) calculated from the stoichiometric equation.

#### 4.2.4.2. Bioreactor model

The perfectly mixed fed-batch reactor can be described by the following set of equations:

$$\frac{dV}{dt} = F(t) \quad \text{Equation III- 4}$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{1}{V(t)} (R_X - X \frac{dV}{dt}) \quad \text{Equation III- 5}$$

$$\frac{dS_i}{dt} = \frac{1}{V(t)} (R_{S_i} - S_i \frac{dV}{dt} + F S_{i_{feed}}) \quad \text{Equation III- 6}$$

$$\frac{dS_i}{dt} = \frac{1}{V(t)} (R_{S_i} - S_i \frac{dV}{dt}) \quad \text{Equation III- 7}$$

$$\frac{dS_i}{dt} = \frac{1}{V(t)} (R_{S_i} - S_i \frac{dV}{dt}) + K_L a (S_i^* - S_i) \quad \text{Equation III- 8}$$

Equation (4) was the continuous volume variation in the bioreactor due to  $F(t)$ , the feed medium flow. The equation (5) described the biomass concentration ( $X$ ) changes in the reactor. The equation (6) was for liquid solute  $i$  present in the feed medium flow while other liquid compounds were described by equation (7). For a dissolved gas compound  $i$ , its concentration variation in the reactor was described by equation (8),  $K_L a$  being the overall oxygen mass transfer coefficient and  $S_i^*$  the dissolved gas concentration in saturation conditions.

The reactor volumes varied with continuous addition of the feed solution and with sampling. The sampling volumes were taken into account in further simulations as discrete events by subtracting sampling volumes from the reactor volume. The feed flow rate  $F(t)$  was controlled in order to maintain the reactor pH setpoint. According to the stoichiometric equation, at pH 7, the consumption of the carbon source (acetic acid) led to a consumption of one proton  $H^+$  and the consumption of the nitrogen source ( $NH_4^+$ ) led to the production of one  $H^+$ . Thus, the  $H^+$  production rate could be written:

$$R_{H^+} = \frac{R_{Ac}}{60} + \frac{R_N}{14} \quad \text{Equation III- 9}$$

with  $R_{H^+}$  being expressed in mol  $H^+$ /L.h<sup>-1</sup>,  $R_{Ac}$  being the acetic acid consumption rate expressed in g<sub>acetic acid</sub>/L.h, 60 was the acetic acid molar mass,  $R_N$  being the nitrogen consumption rate expressed in g<sub>N</sub>/L.h<sup>-1</sup> and 14 the nitrogen molar mass. The feed flow rate  $F(t)$ , expressed in L/h, could be theoretically calculated from the  $H^+$  consumption as:

$$F(t) = \frac{-R_{H^+}}{0.94 \frac{S_{Ac\ feed}}{60}} \quad \text{Equation III- 10}$$

with  $S_{Ac\ feed}$  being the acetate concentration in the feed solution and 0.94 the  $H^+$  contribution from feed solution.

The model and the simulation were computed with Matlab software, version R2014b (Mathworks, USA).

### 4.3. Results and discussion

#### 4.3.1. Improvement of the growth phase on acetate as sole carbon source using a fed-batch culture mode

##### 4.3.1.1. Influence of neutral pH for the yeast growth on acetate

Several variables had to be taken into account to improve the kinetic parameters of *C. curvatus* growth using only acetate as carbon source. For example, the initial pH was critical for yeast growth and had a direct impact on the kinetics and yields of a culture. In many publications, *Cryptococcus* cultures remained performed at pH values ranging from 4 to 6 even if the microorganism could tolerate a broader pH range. Fei et al. (2011b) reported that *C. albidus* was able to grow in a pH range from 3 to 8 with an optimum at pH 6. The pH may also influence transport phenomena across membranes particularly when using organic acids as carbon source. Indeed, when a weak organic acid is added in the medium, the undissociated form preferentially enters yeast cells by passive diffusion. Once the acid invades the cell, it dissociates leading to the release of protons. But if this decrease of intracellular pH is too important, it may decrease the activities of metabolic functions, affect signal transduction, protein interaction and cell division rate (Sugiyama et al., 2015).

Casal et al. (2008) have described the entrance of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* cells. VFAs can be transported across the membrane by simple passive diffusion but also through an acetate/proton symport. The active mechanism of transport of carboxylic acids using permeases allows the entry of the anionic form of the acid. This mechanism could be associated with metabolic processes using different regulatory networks involved in the utilization non-fermentable carbon sources (Casal et al., 2008). A similar transport system could be present in *C. curvatus* cell membrane.

In order to study the influence of the dissociation degree of acetate on this transport phenomenon, a batch culture at neutral pH was carried out in a bioreactor and compared to results obtained at pH 6.0 which is a classical value used in literature for the growth of *Cryptococcus* (Christophe et al., 2012; Vajpeyi and Chandran, 2015). The acid dissociation constant (pKa) for acetic acid being 4.75, a more important part of dissociated form should be present at pH 7.0 than at pH 6.0. Consequently, a higher concentration of acetate could be transported across the cell membrane through the symporter. Results presented in Table III-5 seemed to confirm the influence of pH in the transport of acetate across the membrane. Indeed, the maximal growth rate ( $\mu_{\max}$ ) of the oleaginous yeast on acetate was improved as much as 50% at pH 7.0 ( $0.28 \text{ h}^{-1}$ ) in comparison to pH 6.0 ( $0.19 \text{ h}^{-1}$ ). This maximal growth rate was much higher than those reported by Vajpeyi and Chandran (2015) for *C. albidus* when grown on a synthetic VFAs mixture at pH 6 ( $0.04 \text{ h}^{-1}$ ). It was similar to the  $\mu_{\max}$  calculated for *Yarrowia lipolytica* grown on glucose ( $0.27 \text{ h}^{-1}$ ) (Ochoa-Estopier and Guillouet, 2014) and *R. glutinis* grown on glucose ( $0.28 \text{ h}^{-1}$ ) (Cescut et al., 2014) and remained close to the value reported by Alfenore et al. (2002) for *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose ( $0.39 \text{ h}^{-1}$ ). This data confirmed that pH represented a major parameter which impacted the kinetics of the culture.

Similar trends were observed with the biomass yields. An increase of biomass yield value was obtained with a pH 7.0 culture ( $0.47 \text{ g/g}$ ) compared to the value obtained with the pH 6.0 culture ( $0.40 \text{ g/g}$ ). It should be noticed that these values were close to those already reported for *C. curvatus* and *Y. lipolytica* (Fontanille et al., 2012, Christophe et al., 2012, Ykema et al., 1988). The acid/base balance of acetic acid/acetate pair seemed to be a determining condition to facilitate the transport across the membrane and to significantly improve growth phase parameters. This pH value was conserved for the remaining experiments.



**Tableau III-5. Comparison of the results of yeast cultures at various pH and carbon sources.**

Strain	<i>C. curvatus</i>			<i>C. albidus</i>			<i>C. albidus</i>	<i>Y. lipolytica</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Substrate	Acetate			VFAs			VFAs	Glucose	Glucose
pH	6.0	7.0	4.5	6.0	7.0	8.0	6.0	5.6	4.0
Substrate consumed (g/L)	4.3	4.7	-	-	-	-	-	-	-
DCW produced (g/L)	1.71	2.23	0.2	1.1	0.8	0.3	1.1	-	13
Lipid produced (g/L)	0.26	0.40	-	0.3	0.2	0.02	0.32	-	-
Lipid content (%)	15	18	-	26.7	20	5	28.3	-	-
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.40	0.47	-	-	-	-	-	0.49	0.041
$Y_{l/s}$ (g/g)	0.06	0.09	-	-	-	-	0.05	-	-
$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	0.19	0.28	-	-	-	-	0.04	0.27	0.39
G (h)	3.7	2.5	-	-	-	-	17.3	2.6	1.8
Reference	This study	This study		Fei et al., 2011a			Vajpeyi and Chandran, 2015	Ochoa-Estopier and Guillouet, 2014	Alfenore et al., 2002

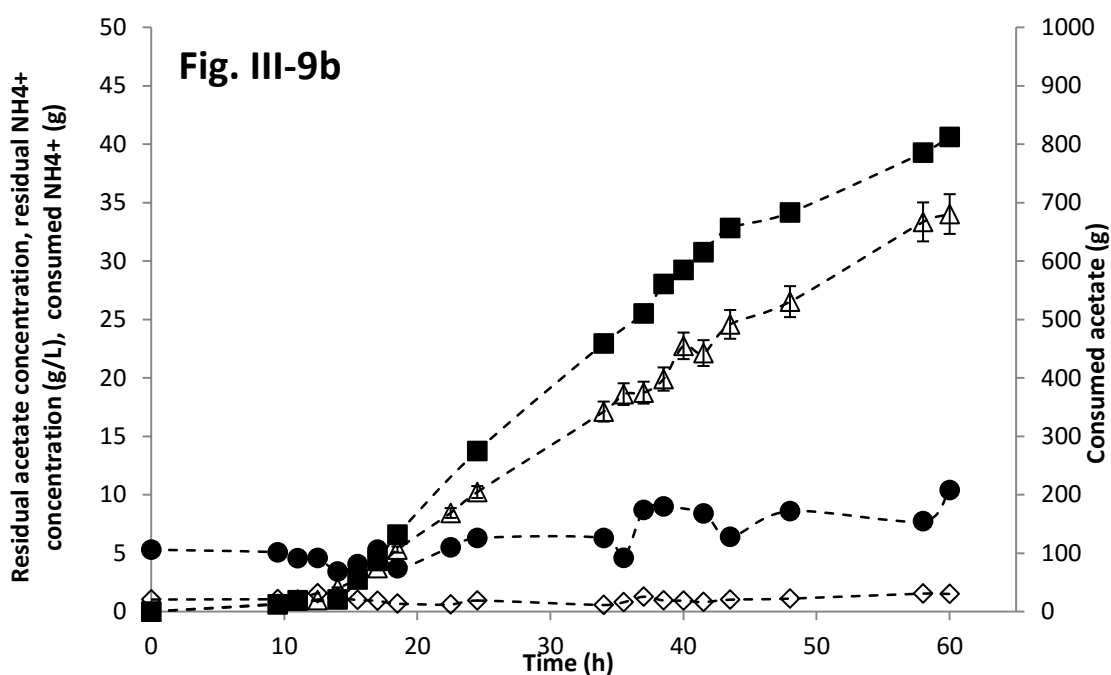
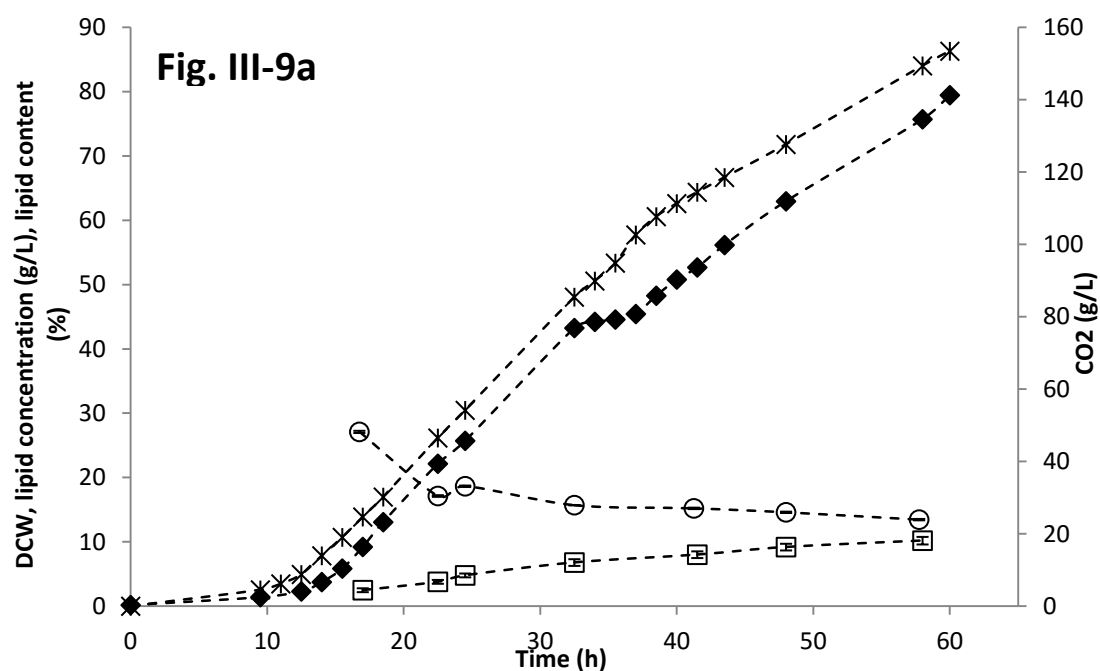
DCW : dry cell weight –  $Y_{x/s}$  : biomass yield –  $Y_{l/s}$  : lipid yield -  $\mu_{max}$  : maximal growth rate – G : generation time.

#### 4.3.1.2. Improvement of the biomass production strategy

A fed-batch culture strategy is the preferred cultivation mode to achieve an important biomass concentration when the substrate exhibits significant toxicity. The sequential additions of the substrate may be achieved based on the calculations of the carbon consumption rate (Fontanille et al., 2012), the evolution of the dissolved oxygen value (Meesters et al., 1996) or the determination of the residual substrate concentration in the culture medium. However the time delay between the substrate consumption and the substrate addition may result in a carbon limitation during the culture. In too large amount, acetic acid additions also cause important pH decreases which may disturb the yeast culture.

The acetate consumption is directly linked to the rise of pH. A modification of the pH regulation system was developed in order to compensate the pH variation by the addition of a synthetic feed medium containing acetic acid and nitrogen source ( $\text{NH}_4^+$ ) instead of using a classical  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution. Acetate could be automatically added in the medium through this control-command system and be available for the yeast growth. This new regulation system allowed maintaining a stable concentration of the carbon and nitrogen sources in the bioreactor. The C/N ratio of the medium was close to 5. This value was described as one of the most favorable for the growth of *Cryptococcus curvatus* (Ykema et al., 1988).

Results of a fed-batch culture performed with *C. curvatus* using the new pH regulation system are presented in Figure III-9. The fed-batch culture started with an initial acetate concentration of 5 g/L to limit the toxicity of VFA (Fei et al., 2011a; Yahara et al., 2007). The pH was set and regulated at 7.0 while the initial C/N ratio of the culture medium was 10. After inoculation with a pre-culture of *C. curvatus* containing acetate to adapt the yeast to this non-conventional substrate, only a short lag phase of around 5 hours was observed. The yeasts grew rapidly and the maximal growth rate was  $0.26 \text{ h}^{-1}$ , which is similar to the value obtained in the previous section. The respiratory quotient varied from 1 to 1.4 during the whole culture, indicating that the yeast metabolism was completely oxidative. The maximal biomass productivity was reported to be  $1.80 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Even if an oxygen limitation occurred at 20 hour of culture, close to 80 g/L DCW were obtained after 60 hours of culture, corresponding to a biomass productivity of  $1.33 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . This value was significantly higher than the biomass productivities reported in the literature for *Rhodospiridium toruloides* grown on glucose (Li et al., 2007) and *Lipomyces starkeyi* grown on a glucose/xylose mixture (Anschau et al., 2014).



**Figure III- 9. Results of a fed-batch cultivation of *Cryptococcus curvatus* in a 7-L fermenter.** (9a) Time course of dry cell weight (DCW)(♦), lipid concentration (□), lipid content (○) and CO<sub>2</sub> production (×) (9b) Time course of acetate (Δ) and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> consumption (■) and residual acetate (●) and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration (◇). Yeasts were grown on acetate, using a pH regulation system allowing the addition of an acetate/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> feed medium instead of a classic acidic solution. pH was set at 7.0, temperature was set at 30°C.

During the whole culture, lipid concentration increased gradually from 2.5 to 10 g/L at the end of the culture and lipid content was stabilized around 15%. This value corresponds only to the basal content of lipids in yeasts Beopoulos et al., 2009. No accumulation was observed during this growth phase. It

allowed to obtain an overall biomass yield on acetate of 0.47 g/g, which was higher to those reported for *C. curvatus* grown on glycerol (Meesters et al., 1996), *Lipomyces starkeyi* grown on a sugars mixture (Anschau et al., 2014) and *C. curvatus* on acetate (Christophe et al., 2012).

The feeding mode of the process and the experimental conditions used in this experiment may limit the toxicity of the substrate. The improvement of the culture parameters allowed enhancing the kinetics value of a cultivation of *C. curvatus* on acetate and to achieve biomass yields close to those obtained for yeasts grown on classical carbon sources. High biomass concentrations could be achieved in short periods of time. An important lipid amount could possibly be obtained after this high-cell density production step.

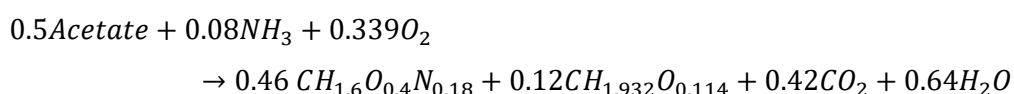
#### 4.3.1.3. Numerical Model

To improve the understanding and the performance of the reactions, a mathematical model based on the stoichiometric equation of the global reaction was developed. Its determination is often necessary for optimal control studies.

The three degrees of freedom stoichiometric equation was solved according to the following experimental results obtained during the fed-batch culture:

- The  $rCO_2/rO_2$  molar ratio was equal to 1,
- The lipid content in the biomass represented 16 to 20% of the dry cell weight, with a molar average formula  $CH_{1.932}O_{0.114}$  for the lipids. The latter has been determined from the fatty acids profile of lipids produced during the culture (Table III-6).
- The biomass yield was 0.47 g dry cell/g acetate.

The mass balanced stoichiometric equation could therefore be written:

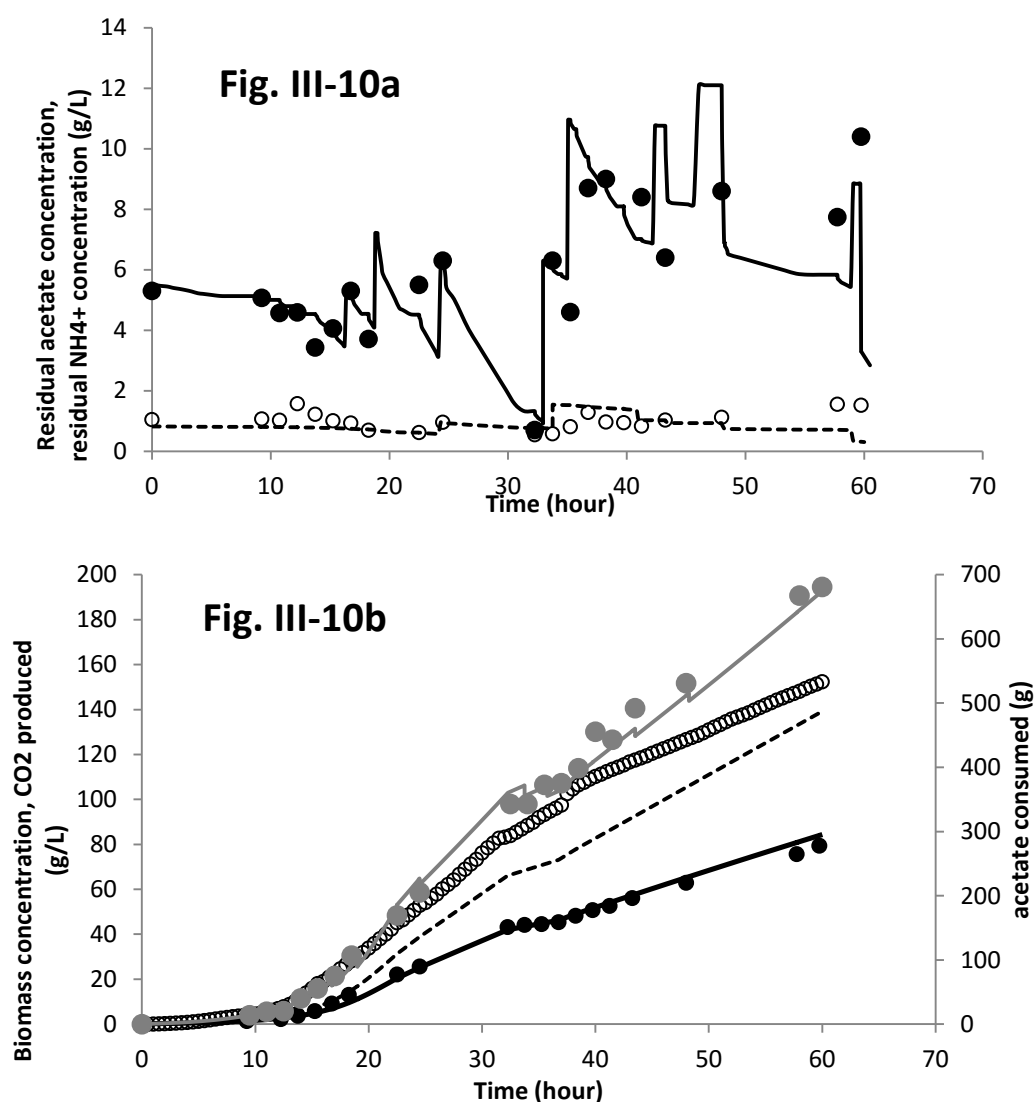


The experimental dry cell biomass values are the sum of non-lipid biomass and lipids.

The biological parameters used for the development of the model were:  $\mu_{max}$ : 0.25 h<sup>-1</sup>;  $K_{Sac}$  = 0.01 g/L ;  $K_{SN}$  = 0.01 g/L;  $K_{SO_2}$  = 0.0001 g/L.  $K_{La}$  value was estimated at 50 h<sup>-1</sup> for a gas flow rate of 0.5 L/min.

In the model, the pH was assumed constant and the feed medium rate was computed by the equation 10 to simulate the pH regulation system.

Experimental data were compared to the model values in Figure III-10.



**Figure III-10. Comparison of the experimental values obtained during a fed-batch culture of *C. curvatus* on acetate and the values obtained from a dynamic model.**

(10a) Residual acetate (—) and ammonium (--) concentrations obtained from the model; residual acetate (●) and ammonium (○) concentrations observed during the culture. (10b) Biomass (—), CO<sub>2</sub> (--) concentrations, consumed acetate (—) obtained from the model; Biomass (●), CO<sub>2</sub> (○) concentrations, consumed acetate (●) observed during the culture.

The experimental data for residual acetate and ammonium concentrations obtained during the culture remained close to the values expected (Figure III-10a). Biomass, consumed acetate and CO<sub>2</sub> concentrations were also fitted by the model (Figure III-10b) and the feeding strategy was also faithfully predicted by the model (Figure III-10b). This numerical model appeared to be consistent with the experimental data obtained for this fed-batch culture. In the future, this model could then be used as a very interesting predictive tool to optimize this process. It should also be pointed out that the agreement between the model and experimental results demonstrated that pH changes of

the cultivation medium were due only to substrate concentration, i.e. no buffering phenomenon was evidenced.

#### **4.3.2. Bioconversion of acetate into lipids by *C. curvatus* in a two-stage fed-batch culture**

##### **4.3.2.1. Determination of the most accurate C/N ratio for lipid accumulation**

Lipid accumulation may be induced by various culture conditions. Temperature (Fei et al., 2011a), pH (Chi et al., 2011) and aeration rate may be important parameters influencing lipid production. Nutrient limitations in phosphate or sulfate are also determining parameters for lipid accumulation in oleaginous yeasts. For example *Rhodospiridium toruloides* was reported to accumulate 57% lipid in a sulfate-limited medium (Wu et al., 2011). But the best accumulation yields were obtained when the yeasts were nitrogen-limited (Beopoulos et al., 2009; Papanikolaou and Aggelis, 2002). The C/N ratio of the medium is a crucial parameter for lipid accumulation. Ykema et al. (1988) determined that a C/N ratio of 70 led to a lipid content of 50% for *Apiotrichum curvatum* grown on wheypermeate. Fontanille et al. (2012) also reported a maximal lipid content of 40.7% for *Yarrowia lipolytica* cultivated on acetate by maintaining a C/N of 50 during the lipid production. Matsakas et al. (2014) have determined that C/N ratios higher than 100 were more accurate to induce lipid accumulation in a *Lipomyces starkeyi* culture on a sugar mixture.

To identify the most suitable C/N conditions to accumulate lipid in a *C. curvatus* culture on acetate, a multi-phases fed-batch culture was completed. The first phase was realized in conditions defined in the previous part of the study in order to produce a large quantity of biomass. Then, during the next phases, the induction of lipids accumulation was carried out.

Three different C/N ratios (300, 500 and 900) were successively maintained in the medium. The targeted acetate concentrations were obtained by manual additions. Then, the feeding system stabilized the value during several hours. The main results of this experiment are presented in Figure 3. Biomass production strategy developed in the first part of this study was applied during the first 48 hours. A biomass concentration of 23 g/L was obtained with a lipid content of 20%. The biomass yield of 0.45 g/g was in concordance with the value obtained during our previous experiment (phase 1, Figure III-11).

After the 48<sup>th</sup> hour, the acetate/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> feeding solution was changed by an acetate solution containing only low yeast extract concentrations as the nitrogen source. It should be pointed out that this period led to nitrogen limitation, not exhaustion. These conditions have been reported to induce higher lipid contents in oleaginous yeasts and to maintain the basal functions of the cell (Matsakas et al., 2014). This system allowed micro-additions of nitrogen for cell maintenance.

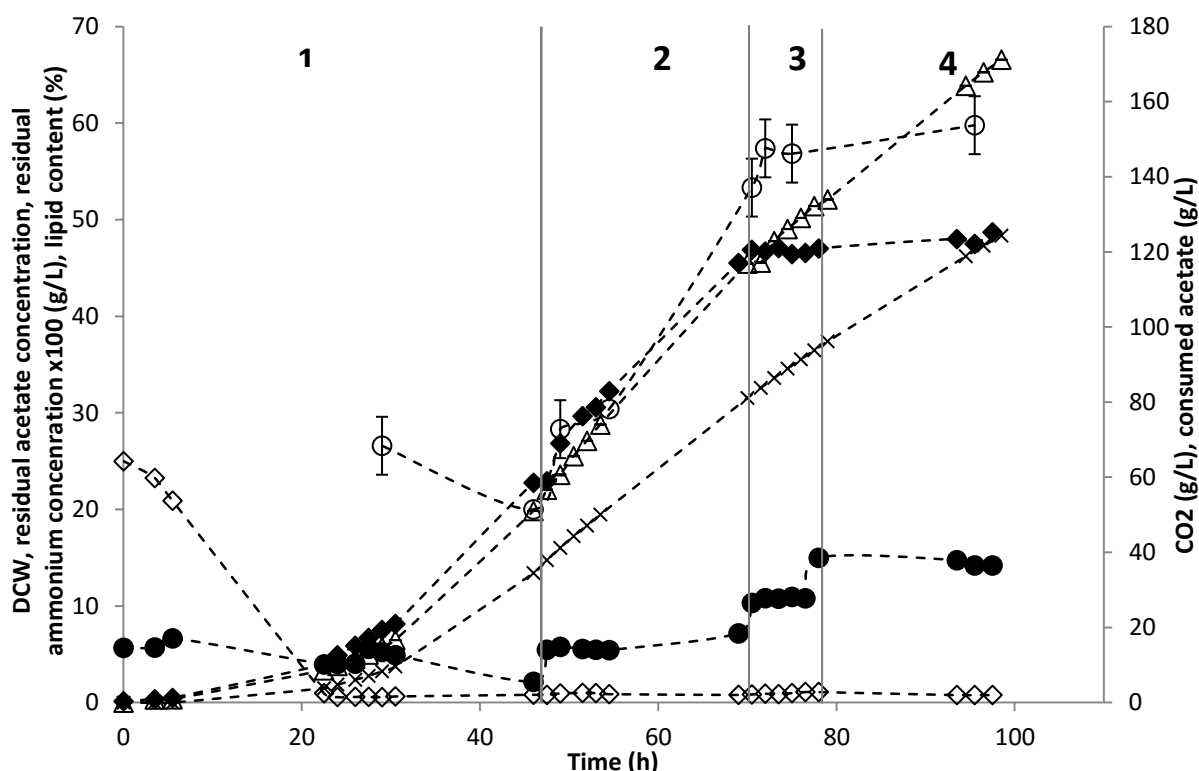
A first C/N ratio of 300 was tested by modifying the residual acetate concentrations in the medium. This value was maintained in the system during 22 hours (phase 2, Figure III-11) thanks to the feeding system. This culture condition allowed a 5.68-fold increase in lipid concentration, which reached 25 g/L after 70 hours corresponding to a lipid content of 53% (Figure III-11). The total biomass concentration was 46 g/L. Biomass yield was reduced to 0.42 g/g while lipid yield increased to 0.23 g/g. The lipid yields obtained for this C/N ratio was significantly higher than those announced for *L. starkeyi*, *C. albidus*, *C. curvatus* grown respectively on sucrose/glucose/fructose mixture, VFAs, acetate (Matsakas et al., 2014; Fei et al., 2011b; Christophe et al., 2012). This value was similar to those obtained for *R. toruloides* grown on classical substrates such as glycerol and glucose (Yang et al., 2014; Wu et al., 2011). This C/N ratio of 300 appeared to be appropriate for lipid production by *Cryptococcus curvatus* on acetate (Table III-4).

From the 70<sup>th</sup> to the 77<sup>th</sup> hours, a C/N ratio of 500 was maintained in the bioreactor. Residual acetate concentration was increased to a value close to 10 g/L while nitrogen concentration remained low. The C/N ratio was then maintained close to 500 (phase 3, Figure III-11). Only a small increase of the lipid content from 53 to 57% was observed and no significant accumulation of biomass was obtained. Finally the residual acetate concentration was increased until 14 g/L, corresponding to a C/N ratio of 900 (phase 4, Figure III-11). Biomass and lipid concentrations did not increase but remained stable at the value of respectively 48.7 and 28.4 g/L, which corresponded to a lipid content of 60%.

For these two last phases, no lethal toxicity was observed in the system even if the acetate concentration was high. An adaptation mechanism may be set up by the yeast during successive increases of acetate into the medium. During the time interval of each phase, the values obtained for biomass and lipids yields decreased significantly. From an economic point of view, considering these yields, an increase of C/N over 300 may not bring any significant improvement for lipids production process even if an increase of 13% of lipids concentration was observed with a C/N ratio of 900. However, these yields remained relatively high, respectively 0.19 and 0.18 if they were calculated at the end of each phase (Table III-4). These values were only available assuming that similar results would be obtained by using directly after the growth phase a C/N value of 500 or 900. This assumption remained to be confirmed.

Beopoulous et al. (2009) have reported for *Yarrowia lipolytica* that an important increase of C/N ratio led to an accumulation of citric acid out of the cell. In this case, the citric acid produced in excess in the mitochondrion cannot be totally cleaved by ATP-citrate lyase. The excess of citrate is then secreted out of the cell leading to an important reduction in the lipids production yields. However, in our case, no citrate was detected in the medium. A complete analysis of metabolites has indicated

that neutral sugars accumulated in significant concentration in the medium (close to 10 g/L) with the increase of C/N ratio. Under certain conditions, yeasts are known to be producers of exopolysaccharides such as mannans, glucans or dextrans (Donot et al., 2012). In particular, *Cryptococcus* sp. has been reported to produce glucans (Bogaert et al., 2009). The identification of sugars was not carried out in this study and will be further investigated.



**Figure III-11. Results of a fed-batch cultivation of *Cryptococcus curvatus* in a 7-L fermenter.**

Time course of dry cell weight (DCW)(◆), lipid content (○), CO<sub>2</sub> production (×), acetate (Δ) consumption, residual acetate (●) and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration (◇). From 0 to 48 hours, growth was promoted (phase 1). pH was set to 7.0 and regulated with an acetate/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> feed medium as acidic solution. From the 48<sup>th</sup> hour, the feed medium was switched to an acetate feed medium, causing a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> limitation, to promote lipid accumulation. Manual acetate additions were realized at 48 (phase 2), 70 (phase 3), 78 (phase 4) hours to increase the residual acetate concentrations to, respectively, 5, 10 and 14 g/L. This corresponded to final C/N ratios of, respectively, 300, 500 and 900.

#### 4.3.2.2. Analysis of the fatty acids profile

The fatty acid composition of the lipids produced by fed-batch culture of *C. curvatus* was determined by GC analysis after a transesterification step (Table III-6). The main fatty acids produced were palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), palmitoleic acid (C16:1), oleic acid (C18:1) and linoleic acid (C18:2). Similar results were obtained with lipid extracted during the previous experiment of *C. curvatus* presented in section 3.2.2. It should be pointed out that no significant differences for lipid



profiles were observed in function of the C/N ratio used. Fei et al. (2011b) and Chi et al. (2011) reported close fatty acid composition for, respectively, *C. albidus* and *C. curvatus* grown on various VFAs. Christophe et al. (2012) reported the presence of linolenic acid in *C. curvatus* oil, which was not observed in this study. This fatty acid composition was quite similar to that of vegetable oils, which were used for the industrial production of biodiesel (Mba et al., 2015).

**Tableau III-6. Comparison of fatty acids profiles of microbial and vegetable oils.**

Species	Palmitic acid	Palmitoleic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Linolenic acid	Reference
<i>C. curvatus</i>	20	Traces	24.5	48.7	6.4	-	Section 3.2.2.
	17.5	0.2	20.5	49.1	15	-	C/N 300, Section 4.3.3.1.
	19.3	0.8	19	47.5	15	-	C/N 500, Section 4.3.3.1.
	20.2	1.6	17.6	44.6	14.9	-	C/N 900, Section 4.3.3.1.
<i>C. albidus</i>	16.1	-	5.1	17.7	61.1	Traces	Fei et al., 2011b
<i>C. curvatus</i>	24	-	13	33	18	9	Christophe et al., 2012
Palm oil	44	0.1	4.5	39.2	10.1	0.4	Mba et al., 2015

#### 4.4. Conclusions

The main objective of this study was to improve the culture parameters of *C. curvatus* for biomass and lipid production using acetate as the sole carbon source. By developing an innovative feeding process, 80 g/L DCW was obtained within 60 hours of culture. A dynamic model was described based on the experimental data and could, in the future, improve this bioprocess. Investigation of the most suitable C/N ratio for lipid production revealed that a C/N of 300 led to a 5.68-fold increase in lipid concentration. This study demonstrated that VFAs, easily obtained from various industrial processes, could be efficiently valorized by microbial oils production, potential feedstock for biodiesel industry.

**Acknowledgements** - This work was carried out in the framework of the Laboratory of Excellence IMobs3. David Duchez is gratefully acknowledged for his help.

## 5. DISCUSSION DU CHAPITRE III

Les sections précédentes de ce chapitre ont permis de mettre en évidence des paramètres clés influant sur la production de lipides à partir d'acétate et d'améliorer à la fois la phase de production de biomasse et la phase d'accumulation de lipides en utilisant un procédé de type fed-batch.

### 5.1. Croissance de la souche oléagineuse *Cryptococcus curvatus* sur acétate

L'intégration de nouveaux paramètres de culture, en association avec une préculture adaptée à l'acétate ainsi qu'un milieu de culture dont la composition présente un rapport C/N proche de 10, permet : (i) une réduction significative de la phase de latence observée en début de culture, (ii) d'obtenir un taux de croissance de  $0,28 \text{ h}^{-1}$  qui est une valeur retrouvée dans la littérature pour des cultures de levures oléagineuses menées sur des substrats classiques, (iii) d'obtenir en l'espace de 60 heures de culture une concentration finale en biomasse de 80 g/L, et (iv) d'obtenir un rendement de production de biomasse élevé de 0,47 g/g.

Cette nouvelle stratégie de culture a donc permis de lever les verrous préalablement observés au cours de la première culture de *C. curvatus* réalisée en fed-batch séquentiel à partir d'acétate. Des valeurs recevables en termes de productivité en biomasse et de vitesse de croissance de *C. curvatus* à partir d'un substrat complexe ont ainsi pu être obtenues, si un scale-up de ce procédé est envisagé.

La croissance de la levure à partir d'acétate est un phénomène se déroulant en conditions aérobies. Lorsque de très hautes densités cellulaires sont atteintes, l'un des challenges afin de préserver des cinétiques de croissance intéressantes sera de maintenir un coefficient de transfert gaz-liquide élevé afin d'obtenir le transfert le plus efficace. Dans le cas de la culture présentée dans l'article, une limitation par l'oxygène est apparue dès lors que la concentration en biomasse a dépassé 13 g/L malgré l'utilisation d'un débit d'aération élevé et d'une vitesse d'agitation maximale pour l'équipement utilisé. Afin de repousser cette limitation par l'oxygène, des modifications concernant l'équipement seront nécessaires (pâles d'agitation, utilisation d'air enrichi en oxygène, contrôle de la surpression dans le ciel du réacteur...). Cependant, même si des améliorations au système sont apportées, il est évident que cette limitation par l'oxygène ne pourra être totalement écartée si la concentration en levures est amenée à être importante.

En conclusion, des paramètres de culture permettant de produire des concentrations en biomasse élevées ont été déterminés. La seconde phase de ce procédé consiste en la production de lipides à partir d'acétate avec l'objectif d'obtenir une teneur et un rendement en lipides élevés. La quantité de lipides finale va dépendre à la fois de la teneur en lipides observée au sein de la biomasse mais également de la concentration en biomasse fournie au cours de la première étape de production.

L'obtention d'une concentration en biomasse importante au cours d'un temps de fermentation court permet donc d'avoir un terrain intéressant pour la production de lipides.

## **5.2. Production de lipides par la levure *C. curvatus* à partir d'acétate**

### ***5.2.1. Evolution de la production de lipides en fonction du rapport C/N du milieu***

Dans l'article présenté, trois rapports C/N représentatifs (300, 500 et 900) ont été maintenus après une phase de production de biomasse. Les résultats obtenus confirment les tendances observées et décrites dans le paragraphe 3.4. Ils montrent que parmi les C/N testés, le rapport de 300 est celui qui permet d'obtenir le meilleur rendement en lipides (0,23 g/g). L'augmentation du rapport C/N s'accompagne également d'une augmentation du pourcentage de lipides intra cellulaires (53, 57 et 60% pour des C/N de respectivement 300, 500 et 900).

Ce travail conduit à la conclusion que l'utilisation d'un rapport C/N de 300 doit être privilégiée pour plusieurs raisons :

- Bien que les teneurs en lipides augmentent avec celle des rapports C/N, la teneur en lipides obtenue lors de la phase de culture se déroulant avec un C/N de 300 demeure toutefois élevée (53%) et recevable pour une mise à l'échelle industrielle de ce procédé.
- Le rendement en lipides est maximal avec l'emploi de ce rapport C/N, ce qui garantit une conversion efficace du substrat vers le produit final désiré.
- L'utilisation de ce rapport permet de réduire la concentration en acide dans la solution d'alimentation et permet une réduction du coût final du procédé en utilisant des quantités moindres de substrat. Comme nous l'aborderons dans le chapitre V, la concentration des AGVs issus de la fermentation anaérobie sera un verrou dans le développement de ce bioprocédé et par conséquent, l'emploi de concentrations plus faibles dans la solution d'alimentation est un avantage non négligeable.

Nous avons abordé dans cette partie le « rapport C/N » du milieu comme paramètre influençant la production de lipides. Cependant il faut également considérer la concentration en azote minimale dans le réacteur. En effet, afin de ne pas compromettre la culture, il est nécessaire d'apporter une source azotée et de maintenir dans le réacteur une concentration en azote basale. A cette concentration en azote résiduelle est associée une concentration en élément carboné, qui permet alors de déterminer le rapport C/N du milieu. Dans les cultures continues présentées dans le chapitre IV, nous avons fait le choix de fixer la concentration de la source d'azote dans les milieux d'alimentation et de faire varier la concentration de la source de carbone (acétate).

### 5.2.2. Analyse du comportement métabolique de *C. curvatus* en fonction des conditions expérimentales.

Les rendements exprimés en Cmol/Cmol<sub>acétate</sub> des différents produits de la réaction ainsi que le bilan carbone ont été réalisés au terme de chacune des phases (croissance et production de lipides) de la culture en fed-batch présentée dans la partie 4.3.2. Ils sont présentés dans les figures III-12 et III-13. Ces résultats permettent de mieux rendre compte des distributions de flux de carbone lors des changements de conditions environnementales. Lors de la phase de croissance, les flux de carbone sont principalement dirigés vers la production de biomasse et de CO<sub>2</sub>. Une faible proportion de carbone est orientée vers la production de lipides, qui sont les lipides constitutifs de la cellule. Il est également intéressant de remarquer que des oses sont produits et excrétés en faible quantité dans le milieu au cours de cette phase de croissance. La quantité de carbone nécessaire à leur synthèse est minime comparativement aux quantités utilisées pour produire de la biomasse et du CO<sub>2</sub>.

Les rendements déterminés lors de la phase de production de lipides montrent un profil radicalement différent. Le rendement en biomasse « active » (c'est-à-dire privée de ses lipides) est 5,5 fois inférieur à celui présenté lors de la phase de croissance. Ceci est cohérent avec l'arrêt de croissance de la souche qui, dans des conditions de limitation azotée, ne peut plus synthétiser les éléments nécessaires à sa multiplication (acides nucléiques, protéines). Le flux de carbone est alors orienté vers la production de lipides. On observe effectivement que le rendement en lipides alors faible au cours de la phase de croissance augmente d'un facteur 2,5 lorsque la limitation en azote est imposée. L'augmentation de la concentration en biomasse totale observée au cours de cette phase de culture est donc principalement due à l'augmentation de la synthèse de lipides.

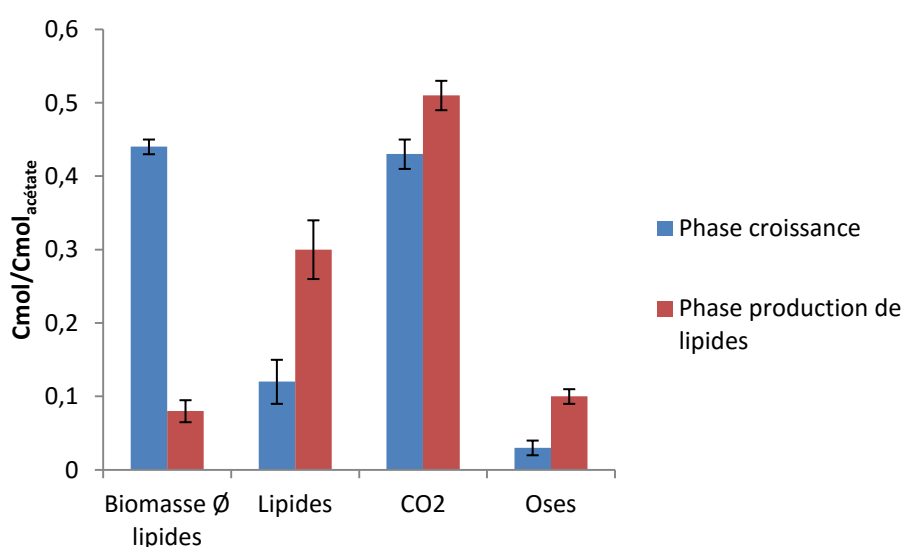
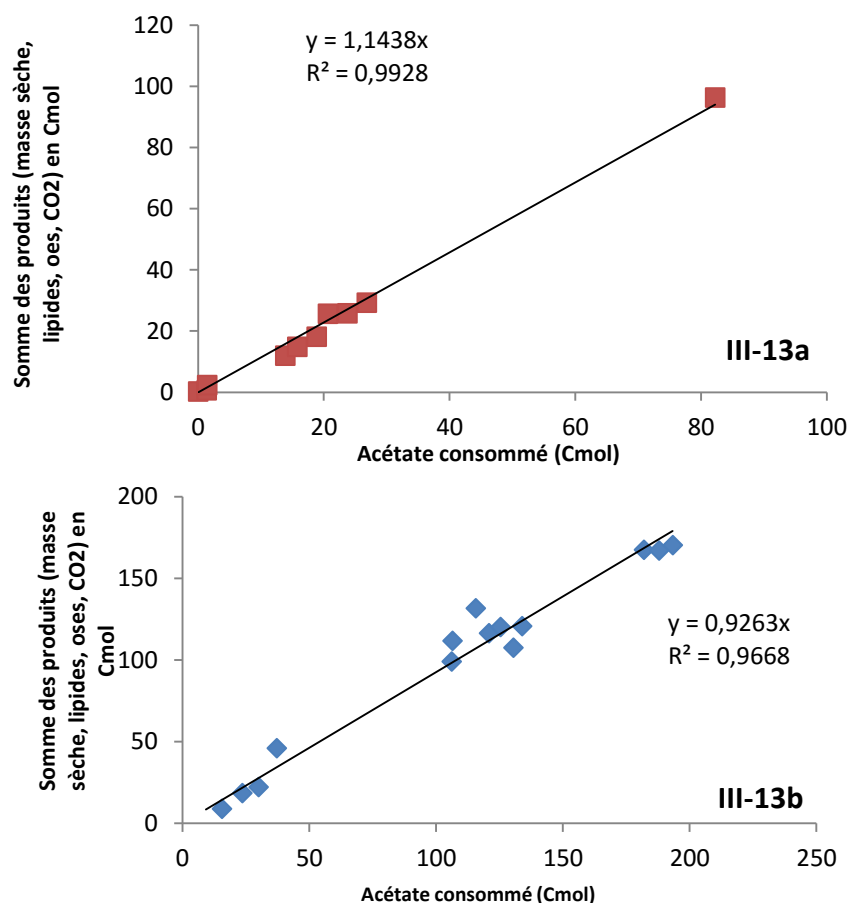


Figure III-12. Evolution des rendements en biomasse (privée de ses lipides), CO<sub>2</sub>, lipides et oses en fonction de la phase de culture.

Une production d'oses se déroulant en parallèle de la production de lipides au cours des fermentations a également été mise en évidence. Ce phénomène est peu abordé dans la littérature, bien que des levures productrices d'oses (polysaccharides de type galactanes, glucanes et pullulanes par exemple) aient été identifiées (Donot et al., 2012). Chez certaines espèces de *Cryptococcus*, mais également de *Rhodotorula* (dont l'espèce *Rhodotorula glutinis* est connue pour être oléagineuse), des glycanes, des mannanes et des dextranes en particulier peuvent être synthétisés (Donot et al., 2012). Chez certaines levures pathogènes, ces oses représentent un facteur de virulence puisqu'ils forment en se liant une capsule protectrice (Bogaert et al., 2012). Ces molécules excrétées dans l'environnement ne constituent pas une forme de réserve d'énergie comme c'est le cas avec les lipides. En effet, Cerning et al. (1994) ont montré que des microorganismes sécréteurs d'oses (exopolysaccharides) étaient incapables de réutiliser ces molécules. Leur rôle semble se limiter à la protection de la cellule puisqu'ils sont synthétisés dans des conditions de stress. Nos résultats suggèrent que les sucres observés pendant la culture de *C. curvatus* sur acétate sont synthétisés en réponse à la limitation azotée imposée pendant l'accumulation de lipides. Nous montrerons dans le chapitre IV que ces sucres semblent être synthétisés peu avant l'accumulation de lipides lorsque l'azote devient limitant, comme si un mécanisme de protection de la cellule se mettait en place en amont de la production de lipides.

Chez d'autres levures oléagineuses, en particulier *Y. lipolytica*, un autre métabolite est retrouvé lorsque le rapport C/N du milieu devient très élevé : le citrate (Beopoulous et al., 2009). Dans ce cas précis, le citrate produit au cours du cycle de Krebs n'est pas entièrement clivé par l'ATP-citrate lyase mais est sécrété dans le milieu de culture, entraînant une diminution du rendement en lipides. Dans cette étude, le citrate n'a pas été détecté dans le milieu de culture. Les principaux produits retrouvés au cours de cette phase de culture sont donc les lipides, le CO<sub>2</sub> et des sucres comme le confirment les bilans carbone obtenus pour chacune des phases qui sont, dans les deux cas, proches de 1 (figure III-13).



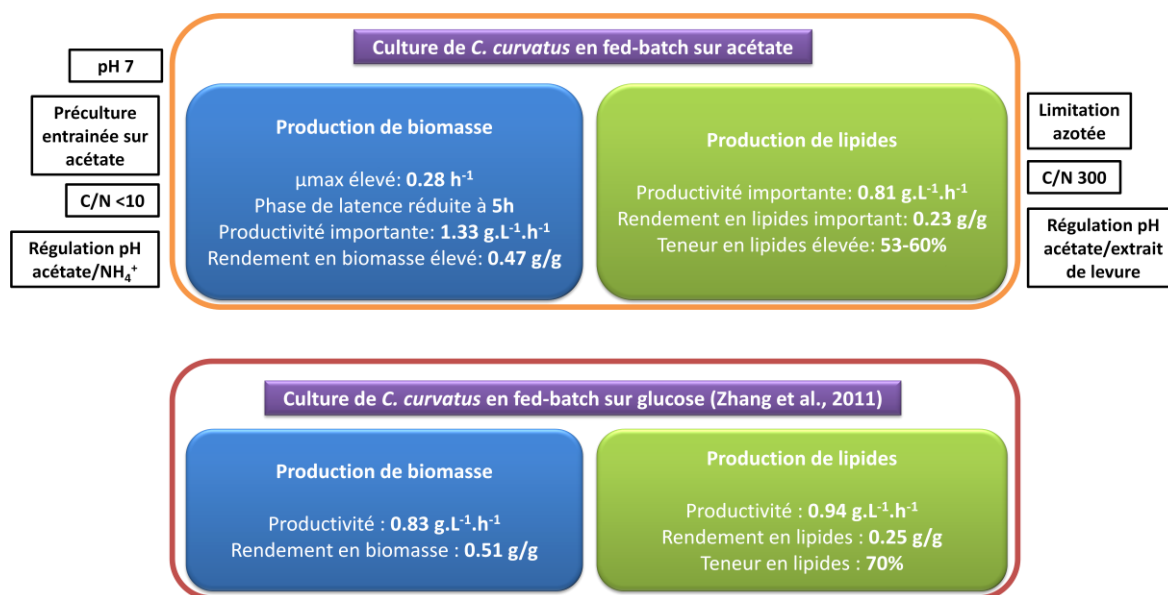
**Figure III-13. Bilan carbone de la culture en fed-batch de *C. curvatus* sur acétate.**

Les produits formés au cours de cette culture sont : la biomasse (privée des lipides), les lipides, le CO<sub>2</sub> et les oses. (13a) Bilan carbone de la phase de croissance, (13b) Bilan carbone de la phase de production de lipides.

### 5.3. Conclusions

Ce premier chapitre de résultats avait comme objectif de rechercher les paramètres opératoires permettant de maximiser les cinétiques de croissance et de production de lipides de la levure oléagineuse *Cryptococcus curvatus* à partir d'acétate en condition de culture fed-batch. L'étude de l'influence du pH et la réflexion autour du mécanisme d'entrée des AGVs dans la cellule ont permis de mettre en place un système performant et automatique de l'alimentation du réacteur via la régulation pH. L'étude de l'influence du pH sur la croissance des levures a montré qu'un pH neutre permettait une assimilation moins toxique de l'acétate par la levure. Des taux de croissance maximaux de près de 0,30 h<sup>-1</sup> ont été obtenus, ce qui est très proche des valeurs maximales de la littérature pour des levures oléagineuses cultivées sur glucose (Cescut et al., 2014, Ochoa-Estopier et Guillouet, 2014) et une concentration en biomasse de 80 g/L est atteinte après 60 heures de culture. La production de lipides a également pu être améliorée. Parmi les différents rapports C/N testés, un

rapport C/N de 300 semble être le plus favorable à la production de lipides (teneur et rendement en lipides élevés) à partir d'acétate. Les résultats obtenus avec *C. curvatus* sur acétate ont été comparés aux résultats d'une culture de cette même souche, réalisée en fed-batch à partir de glucose (Zhang et al., 2011). Cette culture en fed-batch (Zhang et al., 2011) présente, à notre connaissance, les meilleurs résultats en terme de production de biomasse et de lipides obtenus pour cette souche à partir de glucose. Les résultats sont résumés dans la figure III-14.



**Figure III- 14. Comparaison des résultats obtenus à l'issue des cultures de *C. curvatus* réalisées sur acétate et d'une culture de *C. curvatus* réalisée sur glucose (d'après Zhang et al., 2011).**

L'amélioration des conditions opératoires développée au cours de cette étude a permis, malgré la toxicité du substrat utilisé, d'obtenir des performances similaires à celles obtenues pour une culture de la souche sur sucre simple. Une analyse des lipides par chromatographie gazeuse a permis d'obtenir les profils d'acides gras. Des calculs de prédiction des propriétés du biodiesel ont montré que ces compositions en acides gras permettaient d'obtenir du biodiesel répondant à plusieurs exigences des normes européennes et américaines, validant ainsi la possibilité de produire du biodiesel à partir de lipides issus de cultures de levures réalisées sur acétate.

## **CHAPITRE IV : DEVELOPPEMENT D'UNE CULTURE CONTINUE DE *C. CURVATUS* SUR ACETATE : APPLICATION D'UN MODELE DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DE LIPIDES**



## 1. AVANT-PROPOS DU CHAPITRE IV

Le chapitre précédent s'est attaché à décrire une stratégie de culture de la levure oléagineuse *Cryptococcus curvatus* à partir d'un AGV, l'acétate, selon un mode de culture en fed-batch. L'influence de différents paramètres sur la croissance et la production de lipides de la souche a été analysée et a permis d'améliorer le procédé en maximisant la concentration en biomasse et la teneur en lipides finale malgré la toxicité du substrat employé.

La figure IV-1 présente une autre stratégie envisagée dans le cadre du couplage des procédés, pendant laquelle les AGVs issus du compartiment de fermentation anaérobie producteur d'hydrogène seraient concentrés et apportés en continu à la culture de levures oléagineuses. L'un des avantages de la culture continue par rapport aux cultures en fed-batch est qu'elle présente, lorsque le régime permanent est atteint, des valeurs de productivités en biomasse et en lipides stables et, si les paramètres opératoires choisis le permettent, élevées.

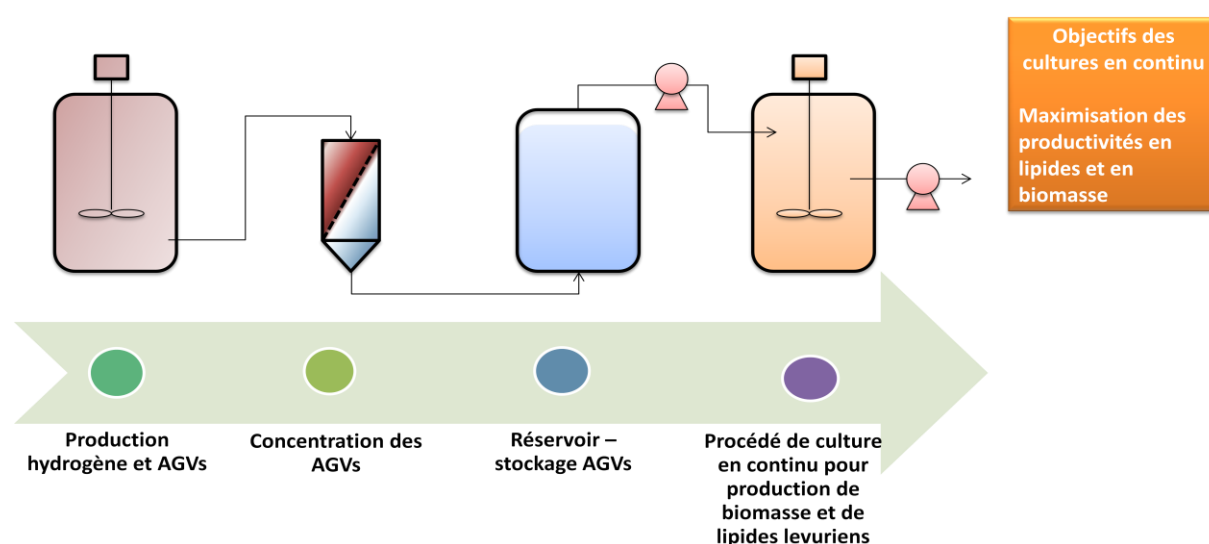


Figure IV- 1. Schéma de la stratégie de culture en continu.

L'objectif général du chapitre IV est de montrer que le procédé de production de lipides par *C. curvatus* à partir d'une solution d'AGVs peut également être envisagé selon un mode continu (figure IV-1). Ce mode de culture permet en effet de maîtriser finement les apports du substrat à l'entrée du réacteur, ce qui limite sa toxicité, et d'imposer à la levure des conditions de culture parfaitement stables.

L'un des objectifs de ce chapitre va donc être la détermination des paramètres opératoires influençant positivement les productivités en biomasse et en lipides par la levure oléagineuse *C. curvatus* à partir d'acétate au cours d'un chémostat. Cependant, les cultures continues sont des procédés longs à mettre en place et sujets à la contamination. Déterminer les paramètres opératoires permettant d'obtenir des productivités en lipides élevées par comparaison de plusieurs cultures continues est par conséquent un processus chronophage. C'est pourquoi l'utilisation d'un outil de prédiction tel que la modélisation constitue un atout et un gain de temps considérables afin d'identifier les paramètres importants tels que le taux de dilution optimal et le rapport C/N des solutions d'alimentation favorables à la production de lipides. L'intérêt de développer un modèle de croissance et de production de lipides pour la mise en place de ce type de bioprocédé est également d'améliorer la compréhension globale des réactions mises en jeu.

Pour mener à bien cette étude, l'influence de différents paramètres opératoires (taux de dilution, limitations par l'azote et par l'oxygène) sera d'abord présentée. La construction du modèle de croissance et de production de lipides de la souche de levure oléagineuse *C. curvatus* cultivée sur acétate fait ensuite l'objet d'une seconde partie. Ce modèle a été mis au point à partir de cultures en fed-batch présentées dans le Chapitre III. L'utilisation de ce modèle comme outil de prédiction et les principaux résultats obtenus seront présentés dans un article intitulé *Validation of a predictive model for fed-batch and continuous lipids production processes from acetic acid using the oleaginous yeast Cryptococcus curvatus* publié dans Biochemical Engineering Journal en janvier 2016. A partir du modèle de croissance et de production de lipides mis en place, les taux de dilution ainsi que les rapports C/N favorables à la production de lipides ont pu être déterminés et ces prédictions validées expérimentalement par une culture de *C. curvatus* en chémostat réalisée sur acétate. Les principales conclusions de cet article et une comparaison entre les valeurs obtenues selon les modes de culture disponibles pour la production de lipides sont abordées dans une dernière partie.

## 2. INFLUENCE DES PARAMETRES OPERATOIRES SUR LA PRODUCTION DE LIPIDES EN CHEMOSTAT

Cette partie s'intéresse à l'étude des paramètres opératoires susceptibles de favoriser la productivité volumique horaire en biomasse et en lipides lors d'une culture continue de la levure oléagineuse *C. curvatus*. La productivité volumique horaire en lipides, lorsque le régime permanent est atteint, est déterminée par le calcul suivant :

$$P_L = C_L \times D$$

Equation IV-1

Avec :

- $P_L$  productivité volumique horaire en lipides ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )  
 $C_L$  concentration en lipides obtenue en régime permanent ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $D$  taux de dilution ( $\text{h}^{-1}$ )

A partir de cette expression, deux paramètres se révèlent particulièrement importants pour maximiser cette productivité en lipides : le choix du taux de dilution employé au cours du chémostat ainsi que des paramètres de culture influant sur la concentration en lipides. Dans la littérature, de nombreux travaux se concentrent sur la détermination du taux de dilution optimal pour la production de lipides en continu (Papanikolaou and Aggelis, 2002; Shen et al., 2013) mais également sur les limitations nutritionnelles susceptibles d'impacter la concentration en lipides au sein des cellules (Kavšček et al., 2015; Ykema et al., 1988). L'objectif de cette sous-partie sera par conséquent de présenter certaines des conditions opératoires qui maximisent la productivité volumique horaire en biomasse et en lipides de la levure sur acétate au cours d'un chémostat. La détermination précise des paramètres que nous utiliserons afin de cultiver la levure oléagineuse *C. curvatus* à partir d'acétate sera présentée dans l'article *Validation of a predictive model for fed-batch and continuous lipids production processes from acetic acid using the oleaginous yeast Cryptococcus curvatus* introduit dans la partie 4.

## 2.1. Influence du taux de dilution sur la croissance et la production de lipides

Dans un chémostat, l'équation du bilan de biomasse s'écrit :

$$\frac{dX}{dt} = \frac{F}{V}X_0 - \frac{F}{V}X + \mu X - \mu_d X$$

Accumulation de biomasse	=	Biomasse entrante = 0	-	Biomasse sortante	+	Croissance cellulaire	-	Mort Cellulaire (paramètre négligé)	<b>Equation IV-2</b>
-----------------------------	---	--------------------------	---	----------------------	---	--------------------------	---	--	----------------------

Avec :

- $X$  concentration en biomasse  
 $X_0$  concentration en biomasse apportée par le milieu d'alimentation  
 $F$  débit volumique du milieu d'alimentation  
 $V$  volume du réacteur  
 $\mu$  taux de croissance  
 $\mu_d$  taux de mortalité

Lorsque le régime permanent est atteint, alors :

$$\frac{dX}{dt} = 0$$

**Equation IV-3**

D'où :

$$\mu = \frac{F}{V} = D$$

Equation IV 4

D étant le taux de dilution.

Le taux de croissance, en régime permanent, est donc égal au taux de dilution qui peut être fixé par l'opérateur. Ce paramètre a un impact décisif si l'objectif est de maximiser la productivité volumique horaire en biomasse et en lipides lors d'une culture continue. En effet, l'accumulation de lipides dépend fortement du taux de dilution employé. Shen et ses collaborateurs (2013) ont montré que plus le taux de dilution choisi est élevé, plus la teneur en lipides présente dans la biomasse est faible. Inversement, des taux de dilutions faibles permettent de maximiser la concentration en lipides dans la biomasse. Des taux de dilution inférieurs à  $0,06 \text{ h}^{-1}$  sont notamment requis afin d'assurer une conversion optimale du substrat en lipides (Evans and Ratledge, 1983; Ratledge, 1994). Ce résultat a été confirmé par Papanikolaou et Aggelis (2002) qui ont déterminé une productivité en lipides maximale ( $0,12 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) lorsque le taux de dilution employé était de  $0,03 \text{ h}^{-1}$  au cours de culture de *Y. lipolytica* réalisée sur glycérol. Ceci s'explique par le fait que le temps de séjour des microorganismes oléagineux dans le réacteur doit varier entre 12 et 24 heures afin de leur permettre de prélever et de convertir le substrat carboné en lipides (Ratledge, 1994). La recherche du taux de dilution permettant d'obtenir une productivité volumique horaire en lipides élevée lors d'une culture en continu de *C. curvatus* à partir d'acétate est détaillée dans l'article présenté dans la partie 4.

## 2.2. Influence d'une limitation nutritionnelle sur la production en lipides

Comme lors des cultures en discontinu, les limitations nutritionnelles sont utilisées de façon routinière lors des cultures en continu afin d'induire une accumulation de lipides (Gill et al., 1977; Hall and Ratledge, 1977; Papanikolaou and Aggelis, 2002; Rakicka et al., 2015). L'élément limitant est alors apporté au réacteur via le milieu d'alimentation qui apporte également la source de carbone, fourni en excès comparativement à la concentration de l'élément limitant. Si le carbone est l'élément limitant, alors la teneur en lipides obtenue à l'issue de ces cultures varie entre 10 et 20%, signifiant que les lipides produits sont des éléments constitutifs de la cellule (membranes) (Gill et al, 1977). La limitation par l'azote est la plus communément utilisée bien que des limitations par le phosphore et le magnésium permettent l'accumulation de, respectivement, environ 35% et 25% de lipides chez la levure oléagineuse *Candida* 107 (Gill et al, 1977).

Le rapport C/N des milieux d'alimentation est donc un élément décisif afin d'obtenir une concentration en lipides élevée dans le réacteur puisqu'il va déterminer la teneur en lipides dans les cellules. Dans la littérature, des milieux d'alimentation présentant des C/N d'environ 40 sont plébiscités pour accumuler les lipides (Hassan et al., 1993; Rakicka et al., 2015).

Nous avons choisi d'étudier principalement deux paramètres influents que sont le taux de dilution et le rapport C/N afin de maximiser la productivité volumique horaire en lipides lors de cultures en chémostat de *C. curvatus* à partir d'acétate. Afin de mener à bien cet objectif, nous avons choisi de mettre en place un modèle de croissance et de production de lipides de la levure *C. curvatus* à partir d'acétate. La conception de ce modèle est présentée dans la partie suivante.

### **3. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DE LIPIDES DE LA LEVURE *C. CURVATUS* CULTIVEE SUR ACETATE**

Dans ce chapitre, l'objectif est d'identifier les paramètres opératoires permettant une productivité volumique horaire maximale en biomasse et en lipides lors d'une culture en continu en utilisant un modèle comme outil de prédiction des cultures. La construction de ce modèle a été réalisée en plusieurs étapes successives. Dans un premier temps, un modèle de croissance de la levure oléagineuse à partir d'acétate a été développé à partir de résultats expérimentaux de culture en fed-batch. Ce modèle décrit l'évolution de la biomasse dans des conditions où l'azote n'est pas limitant donc sans accumulation de lipides. Dans un second temps, la production de lipides ainsi que la maintenance ont été intégrées à ce modèle afin de le compléter et de décrire au mieux les cultures au cours desquelles la croissance des levures est suivie de l'accumulation de lipides. L'utilisation d'un tel outil, une fois calibré et validé, a permis de prédire différents scénarii de culture et d'identifier les conditions opératoires favorisant la production de lipides et de biomasse.

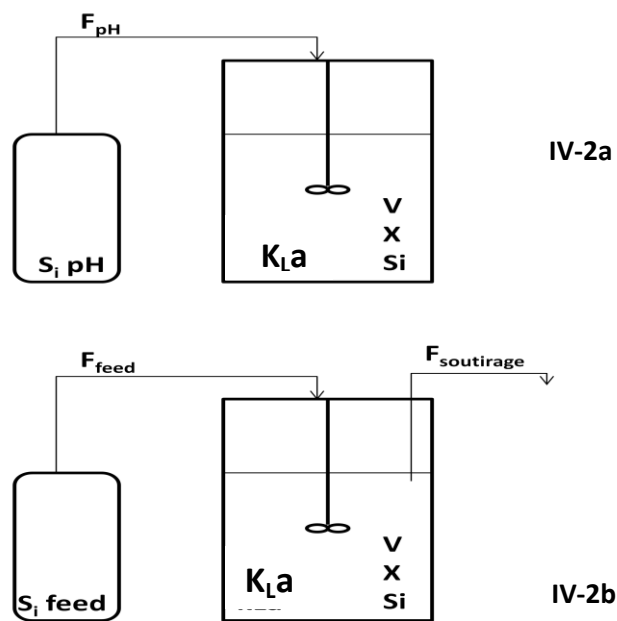
#### **3.1. Représentation schématique du procédé de culture en fed-batch et en continu**

Les dispositifs expérimentaux employés lors des cultures en fed-batch et en continu sont présentés dans la figure IV-2. Les définitions des variables présentées dans ces figures sont listées dans le tableau IV-1.

Dans le cas de la culture en fed-batch (figure IV-2a), ce dispositif est constitué d'un réacteur contenant un volume  $V$  de milieu de fermentation, qui varie suite aux ajouts et aux prélèvements et dans lequel sont présents de la biomasse « active » (c'est-à-dire privée de lipides) à une certaine concentration (notée  $X$ ) ainsi que des substrats consommés (acétate, ions ammonium et oxygène) et des métabolites produits (lipides, oses,  $\text{CO}_2$ ), regroupés sous le terme général  $S_i$ . La croissance et la

production de lipides sont des processus aérobies, ce qui pour la réalisation du modèle implique la prise en compte du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène  $K_La$ . La source de carbone (acétate), présente dans une solution d'alimentation, est apportée au cours de la culture via la régulation pH, donc selon un certain débit notée dans ce modèle  $F_{pH}$ . La solution d'alimentation contient de l'acétate mais également d'autres nutriments tels que les ions ammonium. Ces nutriments présents dans la solution d'alimentation sont appelés dans ce modèle  $S_{i pH}$ .

Dans le cas de la culture en continu (figure IV-2b), le volume  $V$  du réacteur reste constant. Les ajouts sont réalisés de façon continue à partir d'un milieu d'alimentation et à un débit  $F_{feed}$ . Ce milieu d'alimentation contient les nutriments (acétate, ions ammonium, etc) dont la concentration est notée dans ce modèle  $S_{i feed}$ . Parallèlement au milieu d'alimentation apporté au débit  $F_{feed}$ , un soutirage permanent du réacteur a lieu, à un débit  $F_{soutirage}$ . Le volume  $V$  du réacteur étant constant, alors le débit d'alimentation  $F_{feed}$  est égal au débit de soutirage  $F_{soutirage}$ .



**Figure IV-2. Représentation schématique des dispositifs utilisés pour les cultures en fed-batch (2a) et en continu (2b).**

**Tableau IV-1. Nomenclature des variables et paramètres du modèle cinétique.**

	Unité	Culture en fed-batch	Culture en continu
<b>Variables du modèle</b>			
Concentration en biomasse « active » (produit)			X
Concentration en acétate (substrat)			$S_{AC}$
Concentration en ammonium (substrat)			$S_N$
Concentration en dioxygène (substrat)			$S_{O_2}$
Concentration d'un composé i dans le réacteur			$S_i$
Concentration d'un composé i dans le milieu d'alimentation (fed-batch)			$S_{i_{pH}}$
Concentration d'un composé i dans le milieu d'alimentation (continu)	g/L		$S_{i_{feed}}$
Concentration en gaz (phase gazeuse)			$S_{gaz}$
Concentration en gaz dissous en conditions saturantes			$S_i^*$
Constante de demi-saturation de l'acétate			$K_{SAC}$
Constante de demi-saturation de l'azote			$K_{SN}$
Constante de demi-saturation du dioxygène			$K_{SO_2}$
Coefficient de transfert volumétrique en dioxygène	$h^{-1}$		$K_{La}$
Rendement massique d'un composé i	g/g		$Y_{X/i}$
<b>Paramètres cinétiques</b>			
Taux de croissance maximal	$h^{-1}$		$\mu_{max}$
Vitesse de production de la biomasse	$g.L^{-1}.h^{-1}$		$R_X$
Vitesse de réaction	$g.L^{-1}.h^{-1}$		$R_{Si}$
Vitesse de production de lipides	$g.L^{-1}.h^{-1}$		$R_L$
Cinétique de maintenance	$g_{acétate}.g^{-1}.h^{-1}$		$R_m$
Vitesse de consommation de l'acétate	$g_{acét}.L^{-1}.h^{-1}$		$R_{AC}$
Vitesse de consommation de l'ammonium	$g_N.L^{-1}.h^{-1}$		$R_N$
Vitesse de production de proton	$mol_{H^+}.L^{-1}.h^{-1}$		$R_{H^+}$
<b>Paramètres de conduite de procédé</b>			
Volume du réacteur	L		$V_t$
Volume de gaz	L		$V_{Gaz}$
Débit molaire gazeux à l'entrée du réacteur	L/h		$G_{in}$
Débit molaire gazeux en sortie du réacteur	L/h		$G_{out}$
Débit d'alimentation sous contrôle du pH	L/h	$F_{pH}$	
Débit d'alimentation en continu	L/h		$F_{feed}$
Débit de soutirage en continu	L/h		$F_{soutirage}$
<b>Données intervenant dans le modèle</b>			
Masse molaire de l'acide acétique	g/mol	60	
Masse molaire de l'azote	g/mol	14	
Apport de protons à partir de la solution d'alimentation		0,94	

### 3.2. Bilan de matière sur les différents composés

Les bilans de matière expriment le principe fondamental de conservation de la matière. Par conséquent, les équations sont communes à tous les modèles cinétiques. Les bilans de matière sont énoncés ci-dessous pour chaque type de culture (batch, fed-batch et continu).

$$\text{Accumulation} = \text{Entrée} - \text{Sortie} + \text{Conversion}$$

Bilan de matière sur la biomasse active dans le réacteur (en phase liquide) :

$$\frac{dX}{dt} = \frac{1}{V_t} (R_X - X \frac{dV}{dt} - F_{\text{soutirage}} X)$$

Equation IV-5

Bilan de matière sur les substrats et les produits (lipides, CO<sub>2</sub>, oses) dans le réacteur (en phase liquide) :

$$\frac{dS_i}{dt} = \frac{1}{V_t} \left( V_t R_{S_i} - S_i \frac{dV}{dt} + F_{\text{feed}} S_{i \text{ feed}} - F_{\text{soutirage}} S_i + F_{\text{pH}} S_{i \text{ pH}} \right)$$

Equation IV-6

L'équation 6 décrit les variations de concentrations des composés  $S_i$  (substrats ou produits), amenés par la solution d'alimentation apportée via le système de contrôle-commande du pH (cas du fed-batch) ou de façon continue (chémostat) ou synthétisés au cours de la culture. Dans le cas de cette équation, aucun échange gaz-liquide n'est considéré.

Bilan de matière sur les composés gazeux dans le réacteur (en phase liquide) :

$$\frac{dS_i}{dt} = \frac{1}{V_t} \left( V_t R_{S_i} - S_i \frac{dV}{dt} + F_{\text{feed}} S_{i \text{ feed}} - F_{\text{soutirage}} S_i + F_{\text{pH}} S_{i \text{ pH}} + V_t K_L a (S_i^* - S_i) \right)$$

Equation IV-7

Cette équation 7 décrit les variations de concentrations du dioxyde de carbone produit par la levure ainsi que de l'oxygène consommé. Dans ce cas, le terme d'échange gaz-liquide  $V_t K_L a (S_i^* - S_i)$  est considéré. Il est possible de décrire les variations de concentration de l'acide acétique via cette expression, dans ce cas, le terme  $V_t K_L a (S_i^* - S_i)$  n'est pas pris en compte.

Bilan de matière sur les composés gazeux dans le réacteur (en phase gazeuse) :

Afin de compléter ce modèle, une équation-bilan a été déterminée afin de décrire les variations de concentration des composés gazeux (O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>). Il n'a cependant pas été utilisé dans les articles présentés dans ce manuscrit mais pourra être employé dans la suite des travaux afin de prédire l'évolution de ces composés en phase gazeuse.



$$\frac{P}{R.T} \frac{d(V_{gaz} y_i)}{dt} = G_{in} y_{i in} - G_{out} y_{i out} - \frac{V_{Gaz}}{MM_i} K_L a (S_i^* - S_{i liq})$$

Equation IV-8

Avec :

$$V_{Gaz} = V_{réacteur} - V_L, P, \text{ la pression (en Pa) et } T, \text{ la température (en K), constantes}$$

Equation IV-9

Si la vitesse de consommation  $r_{O_2}$  est égale à la vitesse de production  $r_{CO_2}$  alors le débit molaire gazeux en entrée  $G_{in}$  est égal au débit molaire gazeux en sortie  $G_{out}$ . Dans les autres cas,  $G_{in}$  est différent de  $G_{out}$  et devra être calculé en fonction de la quantité molaire de gaz produit (ou consommé).

#### Bilan volumique :

Batch	Fed-batch – apport d’acétate via la régulation pH	Continu
$\begin{cases} \frac{dV}{dt} = 0 \\ F_{pH} = 0 \\ F_{feed} = 0 \\ F_{soutirage} = 0 \\ S_{i pH} = 0 \\ S_{i feed} = 0 \end{cases}$	$\begin{cases} \frac{dV}{dt} = F_{pH} \\ F_{pH} = \frac{-V_t R_{H+}}{0,94 \frac{S_{Ac feed}}{60}} \\ F_{feed} = 0 \\ F_{soutirage} = 0 \\ S_{i feed} = 0 \end{cases}$	$\begin{cases} \frac{dV}{dt} = 0 \\ F_{pH} \text{ négligé} \\ F_{feed} \neq 0 \\ F_{soutirage} = F_{feed} \end{cases}$
Equation IV-10	Equation IV-11	Equation IV-12

En culture fed-batch, le volume du réacteur varie avec l’ajout continu de la solution d’alimentation et les prises d’échantillon. Les volumes des échantillons sont pris en compte au cours des simulations comme des évènements discrets, en soustrayant ces volumes du volume du réacteur.

Le débit de la solution d’alimentation  $F_{pH}$  est contrôlé de façon à maintenir le pH de la culture à 7. Ce débit peut être calculé sachant qu’à un pH de 7, la consommation d’une molécule d’acétate entraîne également la consommation d’un proton. En effet, comme présenté dans l’étude bibliographique, l’entrée dans la cellule de l’acétate s’effectue sous l’action d’un symport proto-moteur. La consommation de la source d’azote ( $NH_4^+$ ) entraîne quant à elle la production d’un proton.

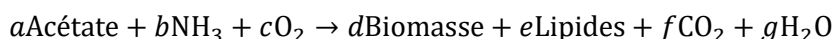
Durant la culture en continu, la variation du volume du réacteur est stable. Le pH est contrôlé via un système de régulation classique (ajout de KOH). Ces ajouts peuvent être considérés comme

négligeables devant les additions du milieu d'alimentation. Ce débit d'alimentation  $F_{\text{feed}}$  est constant au cours du temps (0,160 L/h).

### 3.3. Développement du modèle de croissance de la levure *C. curvatus* cultivée sur acétate

#### 3.3.1. Modèle biologique

La croissance de la levure oléagineuse cultivée sur acétate est décrite par une équation-bilan stœchiométrique du type:



Equation IV-13

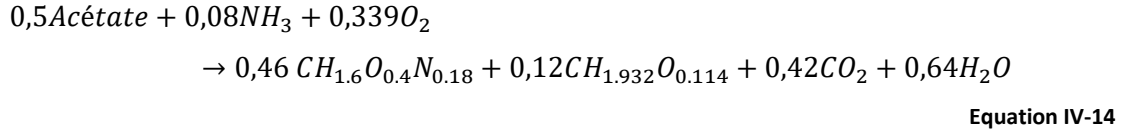
La biomasse présentée dans cette équation représente la biomasse « active », c'est-à-dire la biomasse privée de ses lipides. Les coefficients a, b, c, d, e, f et g sont les 7 coefficients stœchiométriques. Pour être solvable, le problème nécessite au minimum 7 relations linéaires indépendantes. Ces relations sont établies à partir des rendements molaires expérimentaux qui peuvent être calculés à partir des rendements massiques expérimentaux. Deux types de rendements peuvent être utilisés : les rendements calculés par rapport à la biomasse ou ceux calculés par rapport au substrat. La résolution du système d'équations linéaires (7 équations et 7 inconnues) a été effectuée avec les outils d'algèbre linéaire et la méthodologie décrite par Farges et al. (2012).

Pour chaque métabolite, nous avons mesuré soit l'évolution de la concentration en fonction du temps, soit les quantités initiales et finales. Les rendements par rapport aux substrats et à la biomasse sont ensuite calculés. Le rendement molaire est obtenu grâce aux masses molaires présentées dans le tableau IV-2.

**Tableau IV-2. Composition des éléments produits ou consommés au cours des cultures.**

Composé	Formule C-molaire				Masse molaire gC.C-mole <sup>-1</sup>
	C	H	O	N	
Acétate	1	2	1	0	30
Dioxygène	0	0	2	0	32
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		4		1	18
X	1	1,6	0,4	0,18	22,52
CO <sub>2</sub>	1	0	2	0	44
Lipides	1	1,932	0,114	0	15,76
Eau	0	2	1	0	18

Afin de résoudre l'équation 13, les données expérimentales obtenues lors de la culture en fed-batch destinée à produire uniquement de la biomasse (Chapitre III, figure III-9), ont été employées et ont permis d'obtenir l'équation suivante :



A cette équation stœchiométrique est associée une cinétique. Cette équation cinétique du taux de croissance intègre la limitation par trois substrats : l'acétate, les ions ammonium et l'oxygène.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S_{Ac}}{K_{SAC} + S_{Ac}} \frac{S_N}{K_{SN} + S_N} \frac{S_{O2}}{K_{SO2} + S_{O2}}$$

**Equation IV-15**

Cette équation cinétique du taux de croissance est basée sur le modèle de Monod (Monod, 1942) qui est la loi la plus utilisée pour décrire la cinétique de croissance :

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S}$$

**Equation IV-16**

Cette loi suppose que les substrats impliqués sont des composés limitants du taux de croissance. Si  $S \gg K_S$  alors le taux de croissance est proche du taux de croissance maximal. Lorsqu'ils sont soumis à des conditions favorables à la croissance, la vitesse de croissance des microorganismes notée  $R_X$  est proportionnelle à leur concentration  $X$ . Le coefficient de proportionnalité est alors le taux de croissance  $\mu$ . Ainsi :

$$R_X = \mu X$$

**Equation IV-17**

Si l'on remplace le taux de croissance  $\mu$  par l'équation 15, alors la vitesse de croissance associée à l'équation stœchiométrique s'écrit :

$$R_X = \mu_{max} \frac{S_{Ac}}{K_{SAC} + S_{Ac}} \frac{S_N}{K_{SN} + S_N} \frac{S_{O2}}{K_{SO2} + S_{O2}} X$$

**Equation IV-18**

La vitesse de réaction d'un composé Si est associée à la vitesse de croissance selon la relation :

$$R_{Si} = \frac{1}{Y_{X/Si}} R_X$$

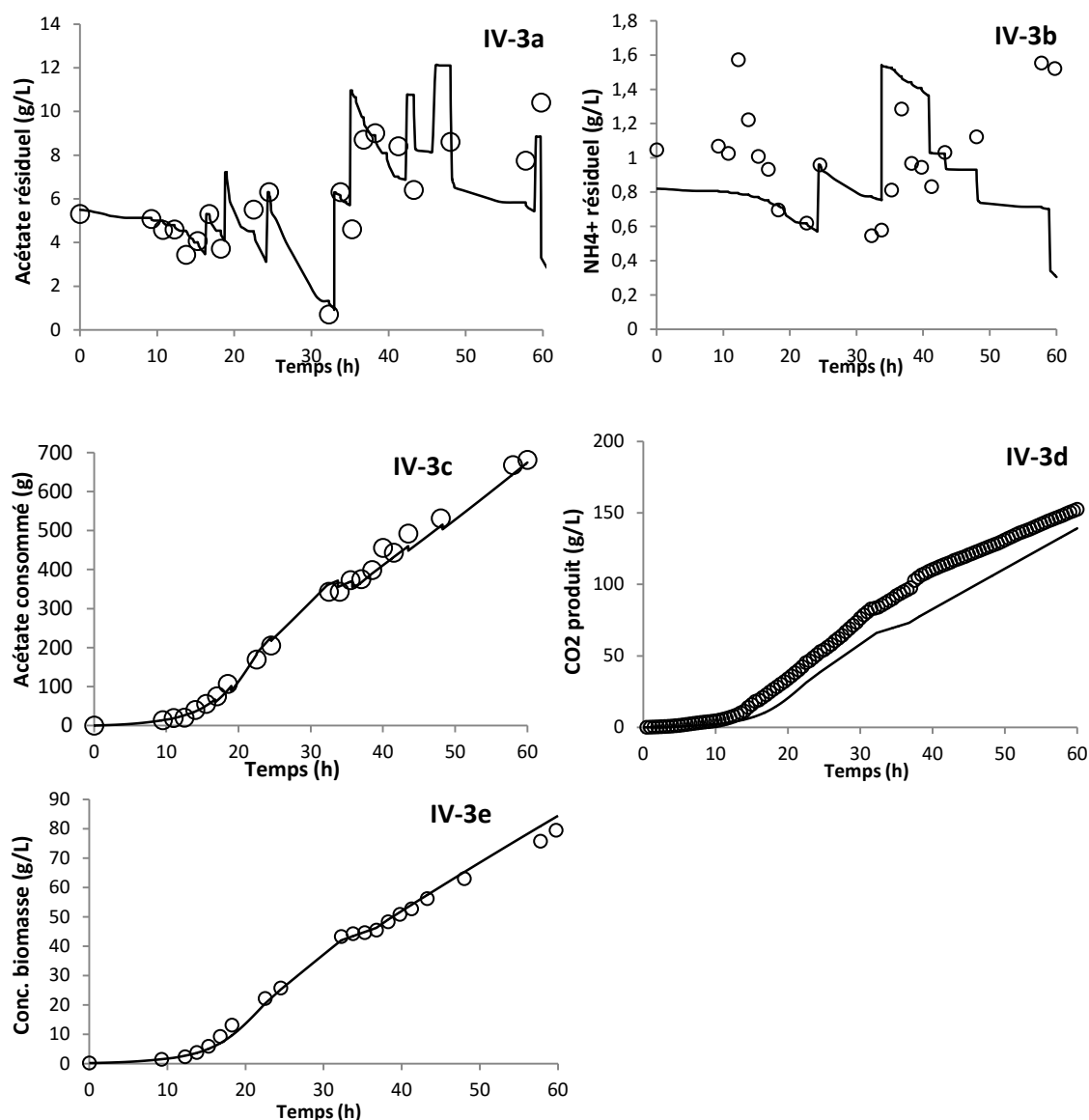
**Equation IV-19**

Si le composé  $S_i$  est consommé au cours de la croissance alors  $Y_{x/S_i}$  est négatif et la vitesse de réaction  $R_{S_i}$  (vitesse de consommation) est négative. Si ce composé  $S_i$  est synthétisé au cours de la croissance ( $S_i = CO_2$ , oses, lipides) alors le rendement  $Y_{x/S_i}$  est positif et la vitesse de réaction  $R_{S_i}$  (donc une vitesse de production) est positive.

### **3.3.2. Calibration du modèle de croissance**

Les résultats obtenus suite à une nouvelle culture en fed-batch de la levure oléagineuse *C. curvatus* à partir d'acétate (présentée dans le chapitre III, figure III-9) ont été utilisés afin de calibrer ce modèle de croissance. Les données obtenues à l'issue de cette culture (concentrations en biomasse, en lipides, en acétate résiduel, en ammonium résiduel, en quantité d'acétate consommé et de  $CO_2$ ) ont été utilisées afin de paramétrer le modèle de croissance de façon à ce que les prédictions décrivent le plus fidèlement possible la culture expérimentale.

Afin de décrire au mieux la culture expérimentale, les paramètres cinétiques et de conduite de réacteur retenus sont reportés dans le tableau IV-3. La comparaison entre les données expérimentales et les prédictions du modèle est présentée dans la figure IV-3. Les valeurs prédites pour chaque paramètre sont proches des valeurs obtenues au cours de la culture.



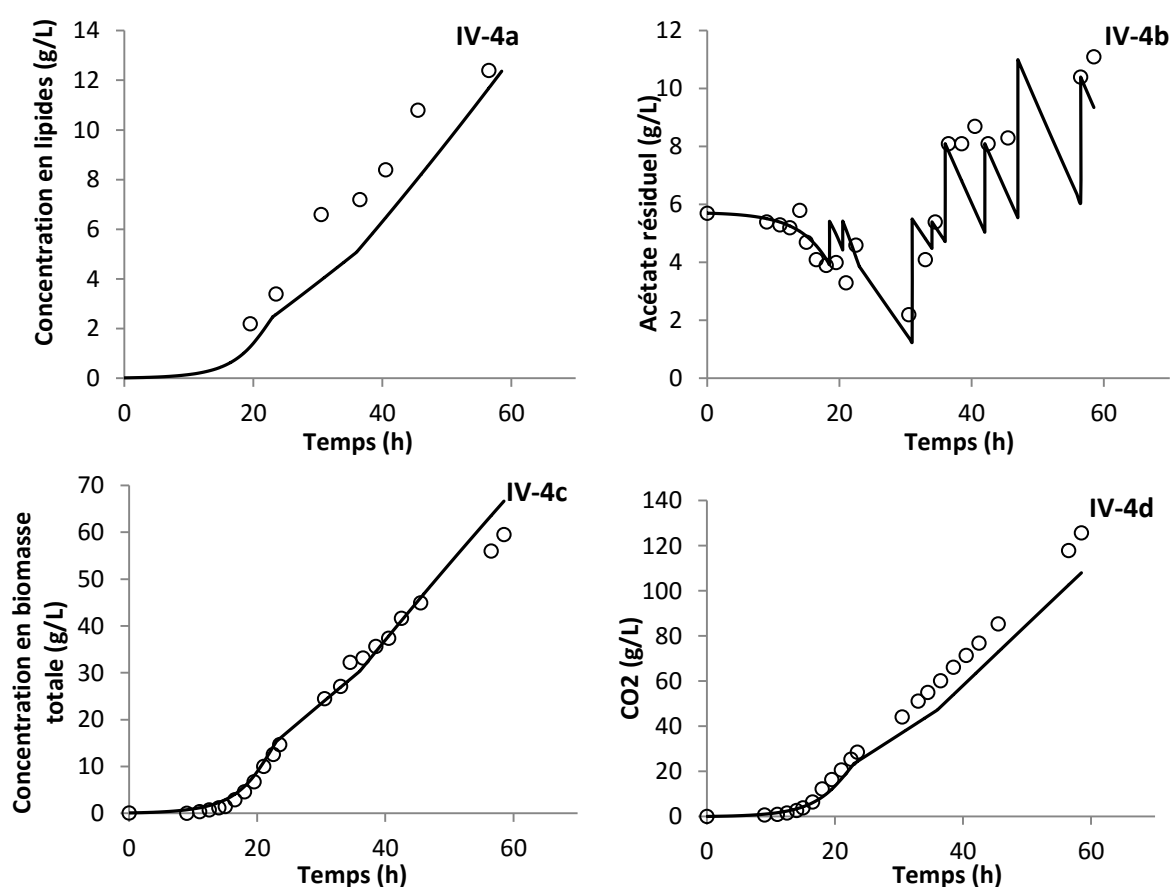
**Figure IV- 3. Calibration du modèle de croissance.**

(-) Prédiction du modèle, (o) Données expérimentales. (3a) Concentration en acétate résiduel, (3b) Concentration en ions ammonium résiduel, (3c) Quantité d'acétate consommé, (3d)  $\text{CO}_2$  produit, (3e) Concentration en biomasse.

### 3.3.3. Validation du modèle de croissance

La validation du modèle de croissance a été réalisée à partir d'une culture en fed-batch de la souche *C. curvatus* cultivée sur acétate (nouvelle culture non présentée dans le chapitre III). Cette culture a été menée selon un mode fed-batch utilisant le système de contrôle-commande du pH afin d'apporter l'acétate au milieu de culture. La solution d'alimentation utilisée pour réguler le pH à 7 présente un rapport C/N de 10. Cette culture a permis d'obtenir en 60h une concentration en

biomasse finale de 60 g/L et une teneur en lipides proche de 20%. Les données expérimentales ont été comparées aux prédictions du modèle. Les concentrations résiduelles en acétate demeurent proches des valeurs annoncées par le modèle de croissance. De la même façon, les données expérimentales concernant les concentrations en biomasse, en lipides et en CO<sub>2</sub> produits par la levure *C. curvatus* sont bien décrites et valident ainsi ce modèle de croissance (figure IV-4). Ce modèle numérique est donc cohérent avec les données expérimentales obtenues, il peut donc être envisagé comme un outil de prédiction afin d'optimiser le procédé de production de biomasse à partir d'acétate. La production de lipides sera par la suite intégrée à ce modèle et est présentée dans la partie 3.4.



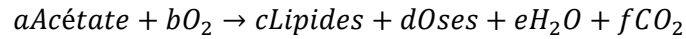
**Figure IV-4. Comparaison des valeurs expérimentales obtenues au cours d'une culture en fed-batch de *C. curvatus* et des données obtenues à partir du modèle de croissance.**

(-) Prédiction du modèle, (o) Données expérimentales. (4a) Concentration en lipides, (4b) Concentration d'acétate résiduel, (4c) Concentration en biomasse totale, (4d) Concentration en CO<sub>2</sub> cumulé.

### 3.4. Développement du modèle de production de lipides et de maintenance

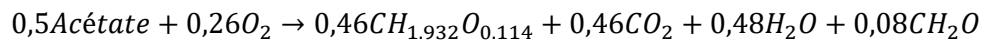
#### 3.4.1. Modèle biologique

Le modèle de production de lipides a été construit en considérant que sous des conditions d'excès en carbone et de limitation azotée, un métabolisme de réserve se met en place, entraînant une production de lipides ainsi que d'oses neutres. De la même façon que pour le modèle de croissance, cette production de lipides peut être décrite selon une équation-bilan stœchiométrique du type :



Equation IV-20

Les lipides ont pour formule C-molaire  $\text{CH}_{1,932}\text{O}_{0,114}$  (tableau IV-3). Nous considérons les oses neutres comme étant des équivalents glucose, de ce fait, la formule molaire qui leur est attribuée est  $\text{CH}_2\text{O}$ . La recherche des coefficients stœchiométriques a, b, c, d, e et f se déroule de façon similaire à celle précédemment réalisée afin de résoudre l'équation-bilan associée au modèle de croissance. Les données expérimentales utilisées pour la résolution de cette équation sont celles déterminées au cours de la culture en fed-batch présentée dans le chapitre III (figure III-11). Nous pouvons de ce fait résoudre l'équation 20 et l'écrire de la façon suivante :



Equation IV-21

Une cinétique de production de lipides notée  $R_L$  est associée à cette équation stœchiométrique. Afin d'écrire cette cinétique, nous avons choisi d'utiliser une approche similaire à celle utilisée pour le modèle de Monod (1942), c'est-à-dire en intégrant les termes limitant cette production de lipides.

La vitesse de production de lipides est considérée comme étant dépendante de la concentration en biomasse, lorsque le milieu de culture présente un excès de carbone et une limitation azotée ( $\text{C/N} > 10$ ). Les termes limitant de la production de lipides sont similaires à ceux retrouvés dans l'équation cinétique du taux de croissance (l'acétate et l'oxygène) qui s'écrivent :

$$\lim_C = \frac{S_{Ac}}{K_{SAC} + S_{Ac}}$$

Equation IV-22

$$\lim_{O_2} = \frac{S_{O_2}}{K_{SO_2} + S_{O_2}}$$

Equation IV-23

De ce fait, ces limitations sont intégrées dans l'expression de cette vitesse de production  $R_L$ .

Le changement métabolique  $\text{Shift}_{RL}$  de la souche (croissance vers la production de lipides) peut être modélisé par une fonction sigmoïde basée sur le terme limitant  $\lim_N$  et peut alors s'écrire :

$$\text{Shift}_{RL} = 1 - \frac{1 + e^{-100 \left[ \frac{1-I_1}{I_1} \right]}}{1 + e^{-100 \left[ \frac{\text{lim}_N - I_1}{I_1} \right]}}$$

Equation IV-24

Avec

$$\text{lim}_N = \frac{S_N}{K_{SN} + S_N}$$

Equation IV-25

Les paramètres définissant la courbe sigmoïde sont la pente ainsi que le point d'inflexion  $I_1$ . Ici, la valeur de la pente a été fixée à -100 pour traduire un changement rapide (pratiquement instantané) du métabolisme. Le point d'inflexion  $I_1$  correspond au centre de la courbe sigmoïdale. Pour une valeur de pente élevée, ce point  $I_1$  correspond à la valeur du terme  $\text{lim}_N$  entraînant le changement métabolique vers la production de lipides.

Lorsqu'une certaine valeur de teneur en lipides maximale (notée  $I_2$ ) est atteinte, la production de lipides s'arrête et peut être décrite par le terme  $\text{lim}_{lip}$ . Ce terme s'écrit de la façon suivante :

$$\text{lim}_{lip} = 1 - \frac{1 + e^{-100 \left[ \frac{1-I_2}{I_2} \right]}}{1 + e^{-100 \left[ \frac{\%lip - I_2}{I_2} \right]}}$$

Equation IV-26

Avec

$$\%lip = \frac{S_{lip}}{DCW}$$

Equation IV-27

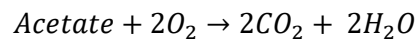
$S_{lip}$  étant la concentration en lipides et DCW la concentration en biomasse totale (lipides compris).

Par conséquent, la vitesse de production de lipides  $R_L$  peut alors s'écrire:

$$R_L = B \times \text{lim}_C \text{lim}_{O_2} \text{Shift}_{RL} \text{lim}_{lip}$$

Equation IV-28

Une fois la teneur maximale en lipides atteinte (et qui marque l'arrêt de la production de lipides), un mécanisme de maintenance se met alors en place. Cette maintenance est décrite par l'oxydation de l'acétate sans production de biomasse ni de composés de réserve. Elle est décrite par l'expression suivante :



Equation IV-29

La loi cinétique associée  $R_m$  s'écrit alors:



$$R_m = m X \lim_C \lim_{O_2} \left(1 - \frac{R_X}{\mu_{max} X}\right) \left(1 - \frac{R_L}{B X}\right)$$

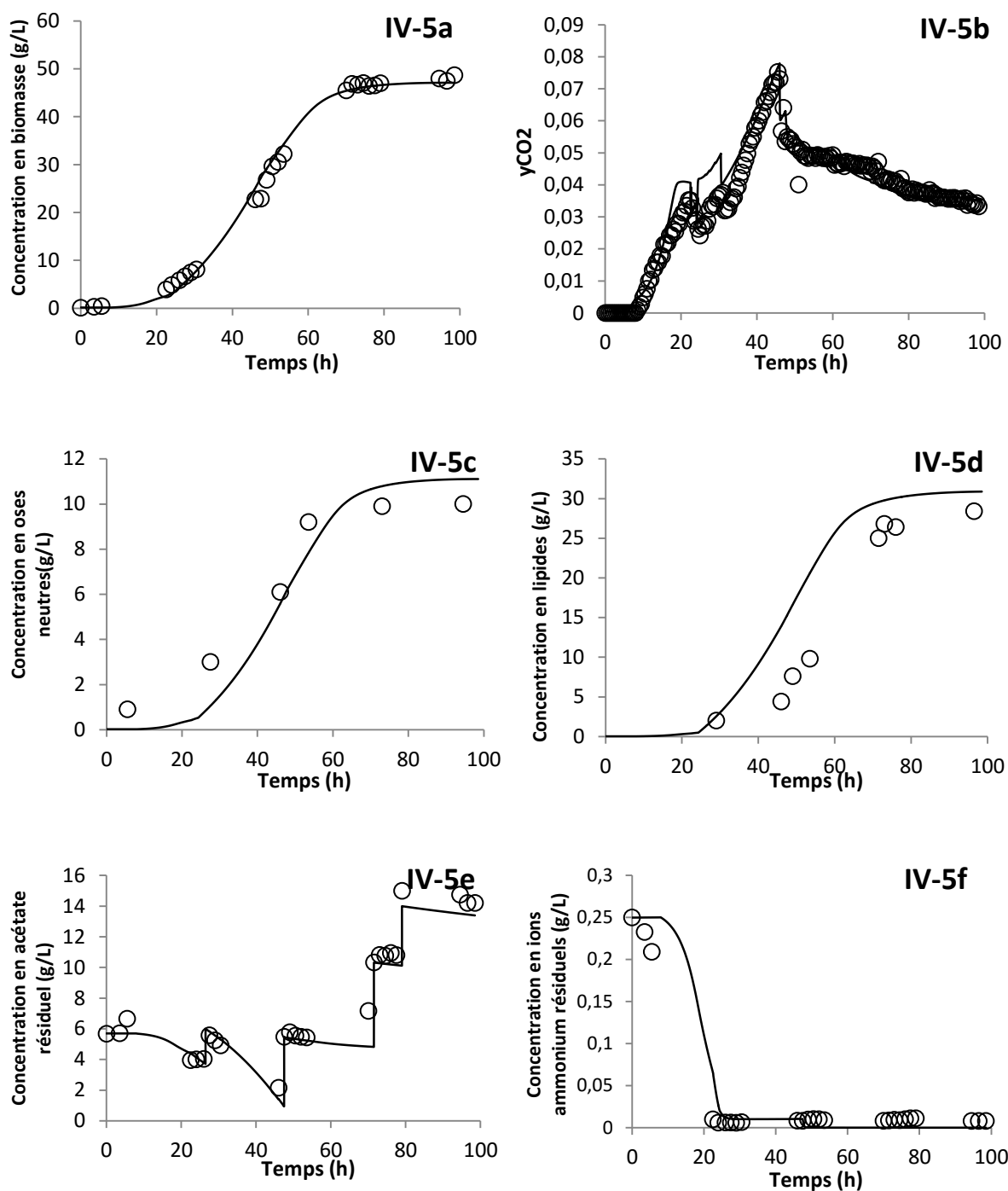
Equation IV-30

La calibration de ce modèle de production de lipides et de maintenance nécessite de calibrer: la stoechiométrie de la production de lipides (correspondant à l'équation 20), la vitesse de production de lipides B, le terme de maintenance m, le changement métabolique  $R_L$ , et plus précisément les points d'inflexion  $I_1$  et  $I_2$ .

### 3.4.2. Calibration du modèle de production de lipides

Afin de calibrer le modèle de production de lipides et de maintenance, les données expérimentales de la culture en fed-batch présentée dans le chapitre III (figure III-11), en particulier la concentration en biomasse, la fraction molaire en  $CO_2$  dans la phase gazeuse, les concentrations en lipides et en oses neutres, ont été utilisées afin que les prédictions du modèle décrivent parfaitement ces données.

Afin de décrire au mieux la culture expérimentale, les valeurs des paramètres B (vitesse de production de lipides), m (terme de maintenance),  $I_1$  et  $I_2$  (points d'inflexion) reportées dans le tableau IV-3 ont été retenues. La comparaison entre les données expérimentales et les prédictions du modèle est présentée dans la figure IV-5. Les valeurs prédites pour chaque paramètre sont résolument similaires aux données expérimentales. Les écarts quadratiques moyens déterminés pour la concentration en biomasse, la fraction molaire de  $CO_2$  et la concentration en oses neutres sont respectivement de 2,25 ;  $3,94 \cdot 10^{-5}$  et 1,45. Les concentrations en lipides obtenues expérimentalement sont proches des valeurs annoncées par le modèle, avec un écart quadratique moyen de 42,34. C'est également le cas des valeurs prédites par le modèle pour l'évolution des concentrations des substrats (acétate et ions ammonium), les écarts quadratiques moyens étant respectivement de 3,45 et  $2,74 \cdot 10^{-4}$ .



**Figure IV-5. Comparaison des valeurs obtenues à partir d'une culture en fed-batch de *C. curvatus* sur acétate et des valeurs prédites par le modèle.**

(-) Valeurs prédites, (o) Données expérimentales. (5a) Concentration en biomasse, (5b)  $y_{CO_2}$ , (5c) Concentration en oses, (5d) Concentrations en lipides, (5e) Concentration en acétate résiduel, (5f) Concentration en ions ammonium résiduels.

### **3.4.3. Validation du modèle de production de lipides**

Le modèle de production de lipides a été validé à l'aide d'une nouvelle culture en fed-batch de la levure oléagineuse *C. curvatus* cultivée sur acétate (celle-ci n'a pas été présentée dans le chapitre III). Cette culture a été réalisée à partir de la stratégie en deux phases présentée au début du chapitre III : croissance de la souche suivie d'une phase d'accumulation de lipides lorsqu'une limitation azotée est imposée. Le mode d'alimentation en acétate du réacteur repose sur le système de régulation du pH.

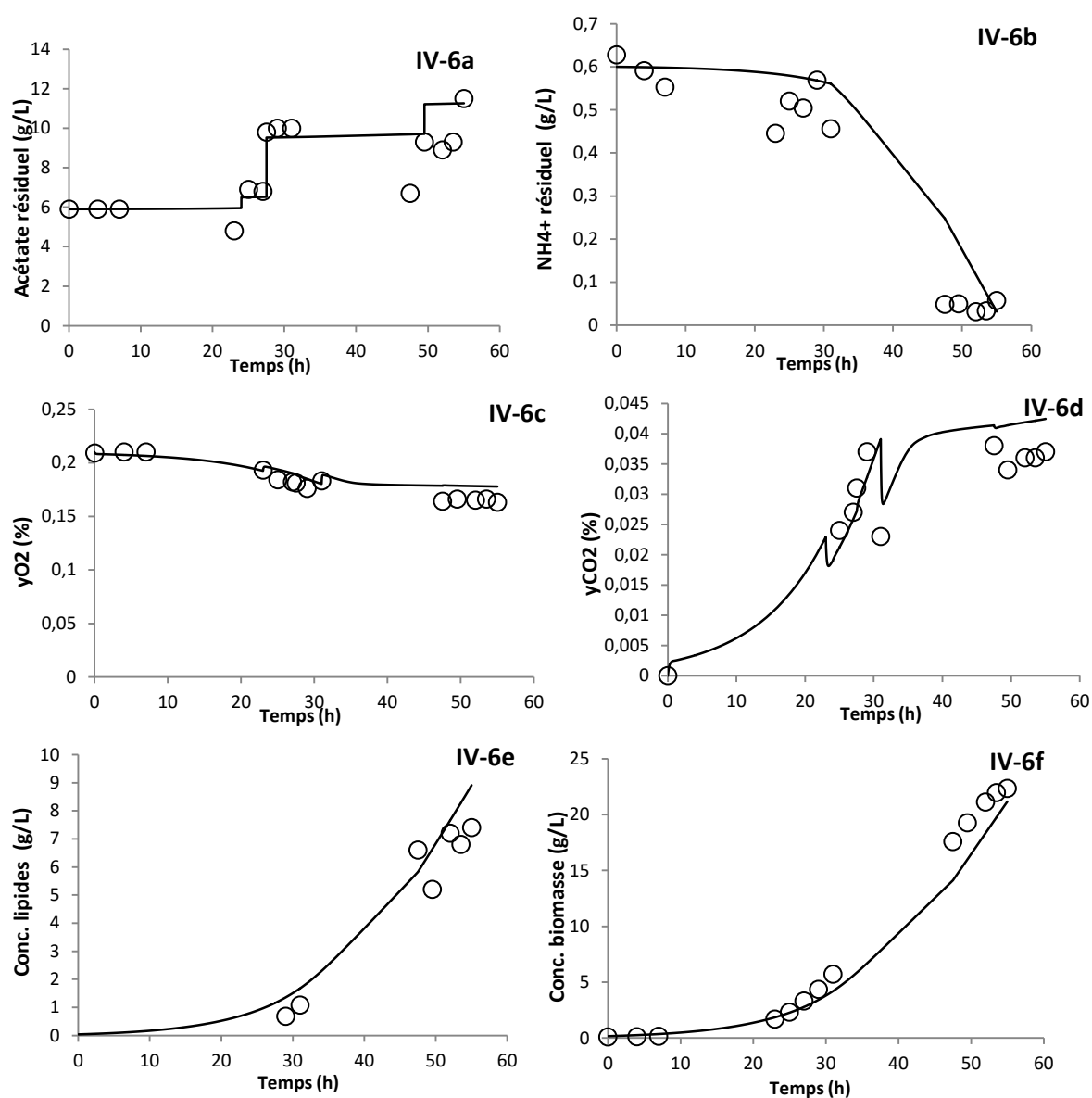
La comparaison des données expérimentales de cette culture avec les prédictions du modèle montre une description fidèle de la culture expérimentale par le modèle de production de lipides. Les concentrations en substrats carboné et azoté résiduelles (figures IV-6a et IV-6b), l'évolution des fractions molaires en CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> (figures IV-6c et IV-6d) ainsi que les concentrations des produits formés : lipides et biomasse (figures IV-6e et IV-6f) annoncées par le modèle sont cohérentes avec les données obtenues au cours de la culture. Cette culture permet donc de valider le modèle de production de lipides.

### **3.5. Utilisation prédictive du modèle de culture de *C. curvatus* pour l'optimisation de paramètres d'une culture en continu**

Le modèle numérique décrivant la croissance et la production de lipides par la souche *C. curvatus* à partir d'acétate permet d'obtenir des prédictions cohérentes quant au développement des cultures. Calibré et validé, il peut par conséquent être utilisé comme outil de prédiction pour simuler des cultures en fed-batch mais également en continu afin d'identifier les paramètres de cultures les plus favorables pour la culture de *C. curvatus* à partir d'acétate. L'utilisation d'un tel mode de culture permet d'analyser, dans des conditions où le rapport C/N est maintenu durant de longues périodes, l'influence de ce paramètre opératoire sur l'accumulation en lipides. Cependant une recherche expérimentale de ces paramètres est un processus chronophage, les cultures continues étant des procédés longs à mettre en place et sujets à la contamination. La démarche adoptée ici a donc été d'utiliser le modèle de croissance et de production de lipides mis en place grâce aux résultats accumulés lors des cultures en fed-batch afin d'identifier par la simulation les valeurs de taux de dilution et de rapports C/N des milieux d'alimentation favorisant l'accumulation de lipides en culture continue.

La recherche de ces paramètres opératoires fait notamment l'objet d'un deuxième article, qui s'intitule *Validation of a predictive model for fed-batch and continuous lipids production processes from acetic acid using the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus**, publié dans Biochemical Engineering Journal.

Cet article propose dans un premier temps le développement du modèle de production de lipides présenté en partie 3.4. La validation de ce modèle de production permet d'envisager son utilisation comme outil de prédiction afin d'identifier de façon relativement rapide les valeurs des paramètres de taux de dilution mais également de rapport C/N de milieux d'alimentation les plus favorables à la production de lipides grâce à une série de simulations de cultures en continu. Une culture expérimentale en continu a ensuite été menée afin de vérifier les prédictions du modèle.



**Figure IV-6. Comparaison des valeurs expérimentales obtenues au cours d'une culture en fed-batch de *C. curvatus* et des données obtenues à partir du modèle de production de lipides.**

(-) Prédiction du modèle, (o) Données expérimentales. (6a) Concentration en acétate résiduel, (6b) Concentration en ions ammonium résiduel, (6c) Evolution de la fraction molaire en  $\text{O}_2$ , (6d) Evolution de la fraction molaire en  $\text{CO}_2$ , (6e) Concentration en biomasse, (6f) Concentration en lipides.

**Tableau IV-3. Données utilisées pour le développement du modèle de croissance et de production de lipides de *C. curvatus* cultivée sur acétate.**

Paramètres		Valeur
Taux de croissance maximal	$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,25
	$Y_{S/X}$ (g/g)	-2,896
	$Y_{O_2/X}$ (g/g)	-1,047
	$Y_{CO_2/X}$ (g/g)	1,784
	$Y_{N/X}$ (g/g)	-0,112
	$Y_{L/X}$ (g/g)	0,182
	$Y_{S/L}$ (g/g)	-3,175
	$Y_{O_2/L}$ (g/g)	-0,489
	$Y_{CO_2/L}$ (g/g)	1,862
	$Y_{N/L}$ (g/g)	0
	$Y_{L/L}$ (g/g)	1
	$K_{SAC}$ (g/L)	0,01
	$K_{SO_2}$ (g/L)	0,0001
	$K_{SN}$ (g/L)	0,01
Vitesse de production de lipides	$B$ ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	0,14
Terme de maintenance	$m$ ( $\text{g}_{\text{acétate}}.\text{g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	0,2
Point d'inflexion entraînant le démarrage de la production de lipides	$I_1$	0,3
Point d'inflexion marquant l'arrêt de la production de lipides	$I_2$ (%)	53
	$V$ (L)	4
	$K_{La}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Evolve en fonction du débit d'aération et de l'agitation
Débit d'aération	(L/h)	
Constante de Henry $O_2$	( $\text{atm.L}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ )	769,2
Constante de Henry $CO_2$	( $\text{atm.L}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ )	29,41
Concentration d'acétate dans milieu d'alimentation	(g/L)	700
Concentration d'ions ammonium dans milieu d'alimentation	(g/L)	27,93

#### 4. VALIDATION OF A PREDICTIVE MODEL FOR FED-BATCH AND CONTINUOUS LIPIDS PRODUCTION PROCESSES FROM ACETIC ACID USING THE OLEAGINOUS YEAST *CRYPTOCOCCUS CURVATUS*

Vanessa Bélignon<sup>a</sup>, Laurent Poughon<sup>a,b</sup>, Gwendoline Christophe<sup>a,b</sup>, André Lebert<sup>a,b</sup>, Christian Larroche<sup>a,b</sup>, Pierre Fontanille<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Université Blaise Pascal, Institut Pascal, UMR CNRS 6602, TSA 60026, CS 60026, F-63178 AUBIERE cedex, France

<sup>b</sup> Université Blaise Pascal, LABEX IMobS3, TSA 60026, CS 60026, F-63178 AUBIERE cedex, France

\*Corresponding author. Email address: Pierre.FONTANILLE@univ-bpclermont.fr

**Abstract:** This study focuses on the use of acetic acid as carbon source for cell mass and lipid production using an oleaginous yeast, *Cryptococcus curvatus*. To improve this cell mass and lipid production on acetic acid, a numerical model was built to predict the yeast behaviour. The model was first calibrated and validated on a fed-batch culture of the oleaginous yeast grown on acetic acid. After the validation step, this model was used as a predictive tool to search for optimal dilution rate and C/N ratios for continuous culture. A continuous culture was then launched using these culture parameters, revealing that the experimental data fitted the model predictions. At steady-state, cell mass concentration was stabilized at 26.7 g/L containing 48 to 53% of lipid content. A maximal lipid productivity of 0.54 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> was obtained, which was superior to those reported in literature. This model could be qualified as a mechanistic one since it allows understanding reactions underlying the lipid production process. The experimental data fitted the model predictions, which confirmed that the use of a model is a powerful and predictive tool which could help the operator to process parameters to improve the culture.

**Keywords:** acetic acid – dynamic modelling – *Cryptococcus curvatus* – yeast – lipid production – bioconversion

##### List of abbreviations

%lip	weight percent, $g_{\text{lipid}}/g_{\text{cell mass}}$ (%)
$\mu_{\text{max}}$	maximal growth rate (h <sup>-1</sup> )
B	lipid formation rate ( $g_{\text{lipid}} \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ )
C/N	carbon to nitrogen ratio (g/g)
DCW	total dry cell weight (g/L)

$F_{\text{feed}}$	feed medium flow rate for continuous culture (L/h)
$F_{\text{pH}}$	acetic acid solution used for pH regulation flow rate for fed-batch culture (L/h)
$G^E$	gas molar flow rate (mol/h)
$He(T)$	Henry's constant at 30°C ( $\text{Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ )
$I_1$	midpoint of the sigmoid curve corresponding to the N-limiting value leading to lipid production (adim)
$I_2$	midpoint of the sigmoid curve corresponding to the maximal lipid content beyond which maintenance state occurs (%)
$K_La$	volumetric oxygen transfer rate ( $\text{h}^{-1}$ )
$K_{sc}$	Monod half-velocity constant, for carbon source (g/L)
$K_{SN}$	Monod half-velocity constant, for nitrogen source (g/L)
$K_{SO_2}$	Monod half-velocity constant, for oxygen source (g/L)
$m$	maintenance term ( $\text{g}_{\text{acetic acid}}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
$P$	absolute pressure (Pa)
$q_L$	specific lipid productivity ( $\text{g}_L\cdot\text{g}_{\text{cell mass}}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$q_s$	specific substrate consumption rate ( $\text{g}_{\text{acetic acid}}\cdot\text{g}_{\text{cell mass}}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$R_m$	maintenance kinetic law ( $\text{g}_{\text{acetic acid}}\cdot\text{g}_{\text{cell mass}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
$R_L$	lipid production rate ( $\text{g}_{\text{lipid}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
$R_{Si}$	liquid solute or dissolved gas compound formation rate ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
$R_x$	cell mass production rate ( $\text{g}_{\text{cell mass}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
$S_C$	concentration of the limiting carbon substrate (g/L)
$\text{Shift}_{RL}$	metabolic shift toward lipid production (adim)
$Si^*$	dissolved gas concentration in saturation conditions (mg/L)
$Si$	liquid solute or dissolved gas compound concentration (g/L)
$Si_{\text{feed}}$	liquid solute contained in the feed medium (g/L)
$Si_{\text{pH}}$	liquid solute contained in the solution used for pH regulation (g/L)
$S_{lip}$	lipid concentration (g/L)
$S_N$	concentration of the limiting nitrogen source (g/L)
$S_{O_2}$	concentration of the limiting oxygen source (g/L)
$V_L$	reactor volume (L)
$X$	lipid-free cell mass concentration (g/L)
$y_{CO_2}$	$CO_2$ molar fractions of air (%)
$Y_{L/S}$	lipid yield (g/g)
$Y_{X/S}$	cell mass yield (g/g)

#### 4.1. Introduction

Petrol is a non-renewable fossil fuel and the development of the world economy relies heavily on its use. However, the decrease in the world reserves and the growing concern of the climate change have drawn the attention towards alternative fuels and particularly biodiesel. Currently, biodiesel is mainly produced from esterified vegetable oils. Nevertheless, these resources do not represent a long-term solution since the use of arable lands towards biodiesel production led to ethical debate and an increase in raw material price. To prevent these situations, oleaginous microorganisms could be used as an alternative solution for lipid production. “Single-cell oils” produced by these organisms present diverse applications in nutrition, pharmaceutical and medical domains, but also in biofuels production. It has been established that the fatty acids profiles of single-cell oils presented similarities to the fatty acids profile of vegetable oils currently used for biodiesel production (Christophe et al., 2012).

Lipid production by oleaginous yeasts from classic carbon sources such as glucose or glycerol is a well-known process (Cescut et al., 2014; Makri et al., 2010; Meesters et al., 1996). These substrates are easily bioconverted into lipids but they present a heavy cost, which hampers the development of this bioprocess (Fei et al., 2011). Several studies focused on the use of wastes as carbon sources, such as biodiesel-derived glycerol (Munch et al., 2015) and agro-industrial residues (Gen et al., 2014; Gong et al., 2014; Huang et al., 2012; Matsakas et al., 2015; Yu et al., 2011). Yeasts of the genus *Rhodospiridium* were able to use these non-conventional substrates and to convert them into lipids (Gen et al., 2014; Munch et al., 2015; Yu et al., 2011). VFAs also constitute a very interesting raw material because they can be produced from a variety of agro-food wastes (Pessiot et al., 2012) and lignocellulosic biomass fermentation.

This work is a part of a biorefinery project that aims to valorize lignocellulosic biomass by hydrogen and microbial lipids production. This is made possible by the development of a two-stage bioprocess, which associated a first bioreactor where hydrogen and VFAs are produced from ligno-cellulosic substrate thanks to an anaerobic microbial consortium. VFAs are then used in a second step as carbon source for biomass and lipid production from oleaginous yeasts *Cryptococcus curvatus*. Previous works revealed that volatile fatty acids, which are classical by-products of hydrogen production, could be used as carbon source for cultivation and lipid production of the oleaginous yeasts *Cryptococcus curvatus* and *Yarrowia lipolytica* (Bélignon et al., 2015; G. Christophe et al., 2012; Fontanille et al., 2012). A two-stage process has previously been developed comprising firstly a strict growth phase, then a phase involving growth and lipids production (Bélignon et al., 2015). Thanks to a



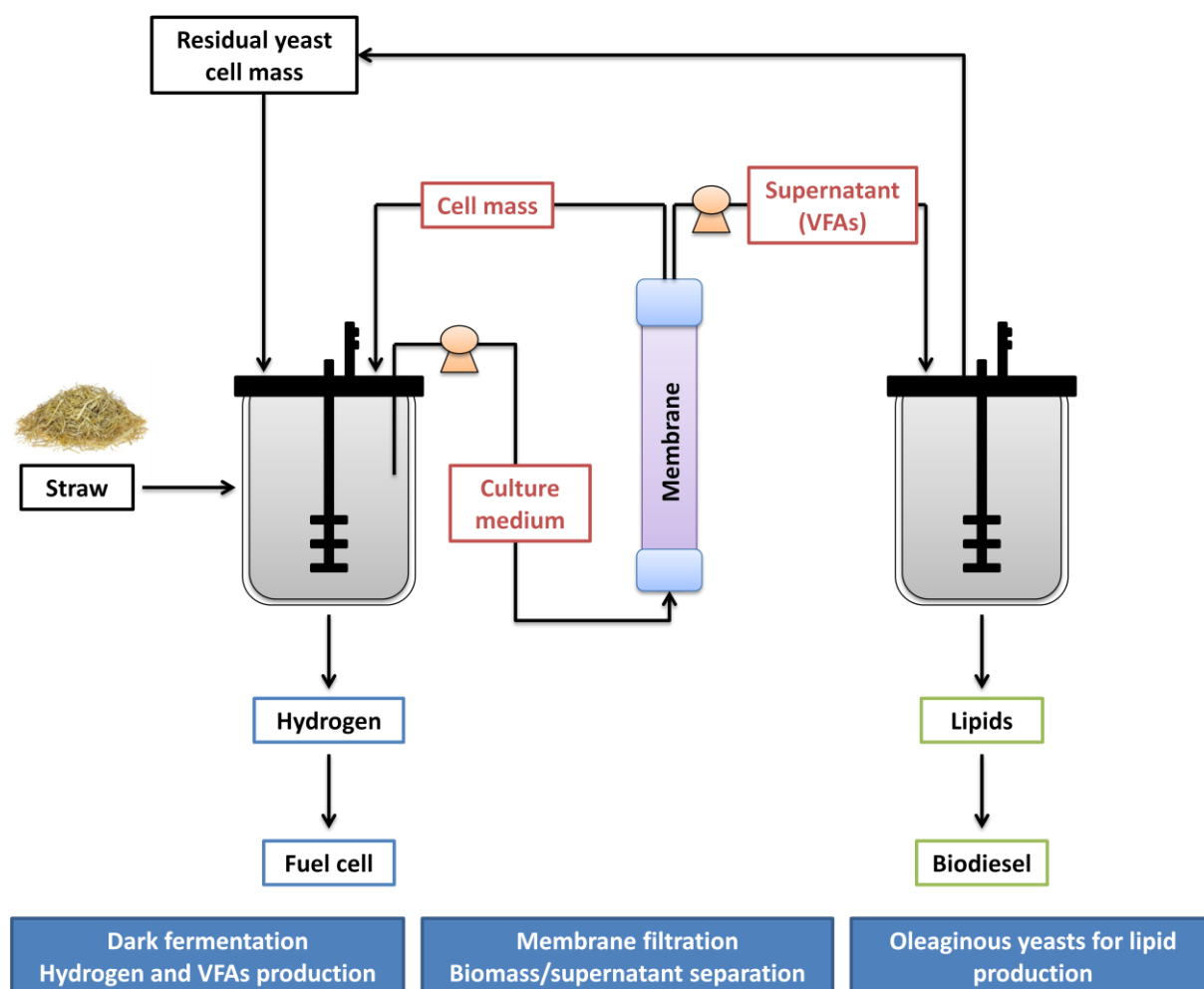
series of fed-batch cultures of the yeast *C. curvatus* on acetic acid previously realized, a growth model was built and described (Béligon et al., 2015).

In order to complete the understanding of the process, the modeling of the growth and lipid production phase of the oleaginous yeast *C. curvatus* on acetic acid, using a fed-batch and a continuous mode was developed and presented in this study. The lipid production model was first calibrated by experimental data of a fed-batch culture. Then, the growth and lipid production model was used to simulate continuous cultures scenario (particularly C/N ratio and dilution rates) to identify the most suitable culture parameters for cell mass and lipid production. Finally a continuous culture with the predicted parameters was performed and validated the model and its use as a powerful predictive tool.

## **4.2. Material and methods**

### **4.2.1. Experimental set-up**

This work is a part of a biorefinery project that aims to valorize lignocellulosic biomass by hydrogen and microbial lipids production, using a two-stage bioprocess presented in the figure IV-7. In a first step, straw is degraded thanks to an anaerobic microbial consortium, leading to hydrogen production. Hydrogen production also generates VFAs, which, at high concentration, may inhibit the gas production. To lower the VFAs concentration, the culture medium is pumped out of the bioreactor towards an immersed membrane. This membrane composed of hollow fibers is used to separate the cell mass from the supernatant. Residual cell mass returns to the first bioreactor while the supernatant, containing the VFAs, is pumped to a second bioreactor. During the dark fermentation phase, VFAs will be continuously withdrawn from the first compartment to avoid an inhibition of the hydrogen production. This second compartment aims at producing lipids by the use of the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* and shall also be run using a continuous mode. Cell mass remaining from the second compartment can be re-injected as substrate in the first compartment.



**Figure IV-7. Scheme of the biorefinery project.**

Straw is used as substrate and enters the first compartment. Dark fermentation producing hydrogen and VFAs occurs in this compartment. Culture medium is pumped outside the reactor during the fermentation. VFAs are extracted from the culture medium thanks to a membrane in between the two compartments. This membrane is composed of 142 hollow fibers with a 0.22  $\mu\text{m}$ -porosity. VFAs are then pumped into a second bioreactor. VFAs are used as substrate for lipid production from oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. Lipids are considered as biodiesel precursors. Residual yeast cell mass could be reinjected in the first compartment as substrate.

## 4.2.2. Culture preparation

### 4.2.2.1. Strain

The yeast strain used in the present study was *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. It was maintained on Potato Dextrose Agar plate at 25°C and sub-cultured every week.

#### *4.2.2.2. Medium culture*

The medium used for preculture, fed-batch and continuous culture in bioreactor contained (in g/L):  $K_2HPO_4$  3;  $NaH_2PO_4$  3;  $(NH_4)_2SO_4$  3;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.04;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.016;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.0038;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0.0005;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.0009;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.00006;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.023;  $H_3BO_3$  0.003; yeast extract 0.1. Carbon source was acetic acid (purity  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, USA). The medium was steam autoclaved at 121°C and 15 psi for a batch time of 20 minutes. To avoid any precipitation in the culture medium, the pH was adjusted to 4.5 before sterilization with orthophosphoric acid and adjusted to 7 after sterilization with a KOH solution.

#### *4.2.2.3. Feed medium used for continuous culture*

Two feed medium with two different C/N ratios were tested for chemostat cultivation. The composition of the first medium was similar to the culture medium previously described except for acetic acid and  $(NH_4)_2SO_4$  concentrations set respectively at 20 and 3.8 g/L. This feed medium presented a C/N ratio of 10. The second one tested was similar to the former one but acetic acid concentration was 100 g/L. This second feed medium presented a C/N ratio of 50.

#### **4.2.3. Inoculum preparation**

For fed-batch and continuous cultures in bioreactors, the inoculum was prepared as follows. 400 mL of the pre-culture medium was transferred into a 2L-Erlenmeyer flask. The medium was inoculated with the colonies picked out from the agar plate and incubated for 30 hours at 30°C. Acetic acid was used as substrate, with an initial concentration of 5 g/L. The incubation took place in a rotary shaker with the agitation speed set at 100 rpm.

#### **4.2.4. Submerged fermentations**

##### *4.2.4.1. Fed-batch culture for lipid production*

Fed-batch culture was previously detailed (Béligon et al., 2015). Yeast culture was performed in an aerated and stirred 7L tank bioreactor (GPC-BIO, La Rochelle, France) with a working volume of 5L. The temperature was maintained at 30°C. Initial acetic acid concentration was 5 g/L. The pH was maintained to 7.0 by automatic addition of concentrated medium containing acetic acid and nitrogen source as soon as pH value exceeded 0.05 the setpoint value. Then, the feed medium was replaced by an ammonium-free solution in order to induce lipid accumulation. The influence of three C/N ratios (300, 500, 900) was tested for lipid production. Compositions of the feed medium used for this fed-batch culture are detailed in previous work (Béligon et al., 2015).

#### **4.2.4.2. Continuous culture**

Continuous culture was performed in an aerated and stirred 7L tank bioreactor (Biostats MD, B. Braun, Melsungen, Germany) with a working volume of 5L. The temperature was maintained at 30°C. A solution of 8N KOH was first used to adjust the pH of the medium to the desired setpoint. pH was then maintained at 7.0 by automatic addition of the feed medium containing acetic acid and ammonium during the first 48 hours of culture and with a 8N KOH solution during the continuous phase. Initial agitation and aeration conditions were set at 400 rpm and 0.5 L/min respectively. These parameters were increased during the culture to avoid oxygen limitation and to maintain the pO<sub>2</sub> value at 50%, leading to a variation of the K<sub>L</sub>a value. Oxygen consumption and carbon dioxide production rates were measured by a gas analyser Oxymat 6E (Siemens, Karlsruhe, Germany). Online data process parameters was done using acquisition software (MFCS Win 2-0, B. Braun, Germany).

The first part of the process was a cell mass production phase under the conditions previously described (Béligon et al., 2015). After 48 hours of culture, continuous phase started. The dilution rate was set at 0.04 h<sup>-1</sup>. pH was kept at 7.0 and temperature at 30°C. Two feed medium with two different C/N ratios were tested for chemostat cultivation. Seven residence times were dedicated to each C/N tested. Steady states were achieved after 3 to 4 residence times.

#### **4.2.5. Analytical methods**

##### **4.2.5.1. Determination of dry cell weight and turbidity**

Turbidity was determined at 600 nm using a spectrophotometer (Safas Monaco, UV mc<sup>2</sup>).

For dry cell weight determination, 5 mL of broth culture were used. Wet cells were recovered by centrifugation at 10 000g for 10 minutes. Dry cell weight was obtained by drying wet cells at 110°C to a constant weight in pre-weighed tubes.

##### **4.2.5.2. Determination of acetic acid concentrations**

The concentration of acetic acid was determined in filtered aliquots of the culture by an HPLC apparatus (Agilent 100, Agilent Technology) fitted with two columns (Rezex ROA 300x7.8 nm, Phenomenex, USA) mounted in serial assembly in an oven (50°C) with a refractometer as detector. The mobile phase consisted of 2 mM sulphuric acid in ultra-pure water pumped at 0.7 mL/min and 70 bars. For the analysis, 2 mL of sample was mixed with 250 µL of Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O (0.3 M) and 250 µL of ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (5% w/v) for proteins removal. The mixture was centrifuged at 10 000 g for 5 minutes.

The supernatant was filtered through a 0.2 µm cellulose acetic acid filter and 10 µL was injected for analysis.

#### *4.2.5.3. Measurement of ammonium nitrogen*

Ammonium concentration was determined by colorimetric method (Patton and Crouch, 1977). Hundred microliters of sample were mixed with 500 µL alkaline hypochlorite, 500 µL of phenol nitroprusside and 3 mL of distilled water. The mixture was incubated at 25°C for one hour and the absorbance was recorded at 570 nm. A calibration curve was done using (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solutions (0-80 mg N/L).

#### *4.2.5.4. Measurement of monosaccharide concentration*

Monosaccharide concentration was determined by colorimetric method (Monsigny et al., 1988) . Two hundred microliters of sample were mixed with 200 µL resorcinol and 1 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The mixture was incubated at 90°C for 30 minutes and left for cooling in the dark for 30 minutes. Each sample was diluted with 1.4 mL H<sub>2</sub>O and the absorbance was recorded at 450 nm. A calibration curve was prepared using glucose solution (0-0.3 g/L). All the colorimetric measurements were performed in triplicate.

#### *4.2.5.5. Cellular lipids extraction and analysis of fatty acid composition*

Culture samples were disrupted at 2500 bar using a bench-top cell disruptor (Constant System Limited, Low March, Daventry NN11 4SD, United Kingdom). 0.5 mL of the milling were mixed with 4 mL of chloroform, 2 mL of methanol and 1 mL of water. After a 10 min-centrifugation step at 2000 g, the organic phase was recovered in pre-weighed tubes. Lipids were obtained after evaporation of the solvent in a speed-vacuum at 40°C until constant weight. Lipids were then conserved in chloroform at -20°C. All the extraction were realized in triplicate.

The fatty acids profile of the lipid was determined by saponification followed by methylation for conversion of fatty acids to fatty acid methyl esters (FAMES) according to the method of Morrison and Smith (Morrison and Smith, 1964). Eight hundred microliters of MeOH/BF<sub>3</sub> (14%) were added to 100 µL of sample and put in a water bath during 15 minutes at 100°C. After the addition of 1.5 mL of water and 750 µL of hexane containing an internal standard (heptadecane, 1% (v/v)), 1 µL was injected in a gas chromatograph (HP6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) fitted with an apolar supelco SPB-5 (Supelco Inc., Bellefonte, PA) capillary column (30 x 0.32 mm i.d., film thickness 0.25 µm) and a flame ionization detector. The oven was programmed to raise its temperature from 170°C

to 220°C at a 3°C/min rate and at the end kept for 3 minutes at 220°C. Nitrogen was the carrier gas at 0.80 mL/min. The split ratio was 1:50 (v/v). The injector and the detector temperatures were set at 250 and 280°C, respectively. The identification of methyl esters was done by comparing the retention times with known standards.

#### 4.2.6. Determination of $K_La$

The determination of  $K_La$  of the reactor used for continuous culture was realised following the gas balance method coupled with sulphite oxidation (Poughon et al., 2003). The reactor (Biostats MD, B. Braun, Melsungen, Germany, with a working volume of 5L) was filled with 10 g/L sodium sulphite dissolved in distilled water. Different combinations of aeration flow (from 1.2 to 2.5 L/min) and agitation (from 350 to 600 rpm) were tested. The oxygen gas composition was measured by a differential analyser Oxymat 6E (Siemens, Karlsruhe, Germany). The oxygen molar fraction of air,  $y_E$ , was measured before each assay. The stabilized oxygen molar fraction of air  $y_S$  was used for the determination of  $K_La$  using the following equation:

$$K_La = \frac{G^E He(T)}{PV_L} \frac{y_E - y_S}{y_S}$$

**Equation IV-31**

with  $G^E$  being the molar flow,  $He(T)$  being the Henry's constant at 30°C,  $P$  being the absolute pressure in the reactor and  $V_L$  the volume of the reactor.

The following grid could be obtained (Table IV-4).

**Tableau IV-4. Determination of the  $K_La$  depending on agitation and aeration parameters in a 7L-bioreactor.**

$K_La$ ( $h^{-1}$ )		Aeration flow rate (L/min)			
		1.2	1.6	2	2.5
Agitation (rpm)	350	42.7 ± 7.3	45.7 ± 2.1	47.6 ± 3.5	49.7 ± 5.7
	400	78.6 ± 4.8	81.5 ± 1.8	83.4 ± 1.1	86.9 ± 0.7
	500	198.3 ± 3.8	200.9 ± 8.1	206.0 ± 9.8	208.2 ± 10.1
	600	422.1 ± 8.5	444.0 ± 1.5	452.9 ± 1.7	461.0 ± 11.5

#### 4.2.7. Numerical methods

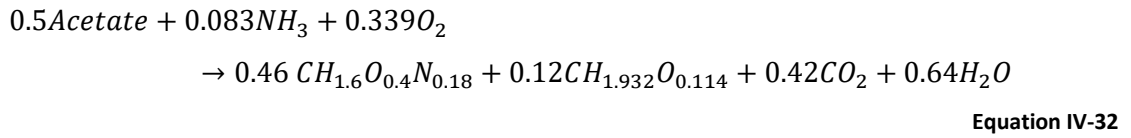
The model and the simulation were computed with Matlab, version R2014b (Mathworks, USA).

### 4.3. Results and discussion

#### 4.3.1. Development of a lipid production model

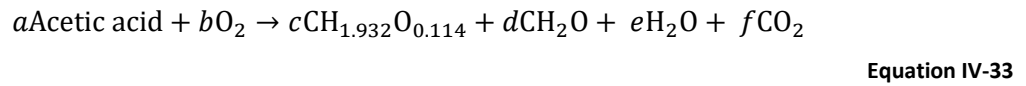
##### 4.3.1.1. Biological model

The growth model was previously described (Béligon et al., 2015) by a single mass balanced stoichiometric equation associated to a classical Monod kinetic law. The C-molar formula of cell mass could be written as  $CH_{1.6}O_{0.4}N_{0.18}$  (Castellanos Estupiñan et al., 2004) and the C-molar formula of lipids was written as  $CH_{1.932}O_{0.114}$ . This stoichiometric equation was written as:



The biological parameters used for the development of the model were :  $\mu_{max}$ : 0.25 h<sup>-1</sup>;  $K_{SC}$  = 0.01 g/L;  $K_{SN}$  = 0.01 g/L;  $K_{SO_2}$  = 0.0001 g/L.

The lipid production model was built on the hypothesis that under conditions of excess carbon source, a metabolism of reserve occurred with lipid droplets and carbohydrates production. This lipid production could therefore assumed to be described by a single mass balanced stoichiometric equation written as:



The carbohydrates  $CH_2O$  are considered as glucose equivalent.

The substrate limiting terms for acetic acid and oxygen are the same as in the growth model. Each limiting terms could be written as:

$$\text{Carbon limitation term, } \lim_C = \frac{S_C}{K_{SC} + S_C}$$

Equation IV-34

$$\text{Nitrogen limitation term, } \lim_N = \frac{S_N}{K_{SN} + S_N}$$

Equation IV-35

$$\text{Oxygen limitation term, } \lim_{O_2} = \frac{S_{O_2}}{K_{SO_2} + S_{O_2}}$$

Equation IV-36

The lipid production rate in nitrogen limiting and carbon excess culture conditions ( $C/N > 10$ ) is assumed function of cell mass concentration. The metabolic shift towards lipid production is modeled by a sigmoid expression based on the nitrogen limiting term  $lim_N$  and could be written as:

$$Shift_{RL} = 1 - \frac{1 + e^{-100 \left[ \frac{1-I_1}{I_1} \right]}}{1 + e^{-100 \left[ \frac{lim_N - I_1}{I_1} \right]}}$$

Equation IV-37

Parameters of the sigmoid are the slope and the inflexion point  $I_1$ . In this case, the slope value was set to -100. The inflection point  $I_1$  is the midpoint of the sigmoid curve, expressed without unit. For high slope value, the inflection point corresponds to the N-limiting value which led to a metabolic switch.

Up to a certain lipid content, lipid production stopped and this could be written as:

$$lim_{lip} = 1 - \frac{1 + e^{-100 \left[ \frac{1-I_2}{I_2} \right]}}{1 + e^{-100 \left[ \frac{\%lip - I_2}{I_2} \right]}}$$

Equation IV-38

With %lip being:

$$\%lip = \frac{S_{lip}}{DCW}$$

Equation IV-39

DCW being the total dry cell weight.

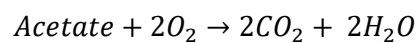
Lipid production rate  $R_L$  could therefore be written as:

$$R_L = B \times lim_c \times lim_{O_2} \times Shift_{RL} \times lim_{lip}$$

Equation IV-40

X being the lipid-free cell mass concentration and B the lipid formation rate.

The maintenance is described by the acetic acid oxidation without cell mass or storage compounds synthesis. It was described by the following equation:



Equation IV-41

The associated kinetic law could therefore be written as:



$$R_m = m X \lim_C \lim_{O_2} \left(1 - \frac{R_X}{\mu_{max} X}\right) \left(1 - \frac{R_L}{B X}\right)$$

**Equation IV-42**

In this model, several parameters must be calibrated from experiments: (i) the lipid production stoichiometry, (ii) the lipid production rate B, (iii) the maintenance term m and (iv) the metabolic shift, i.e. the inflexion points  $I_1$  and  $I_2$ .

#### 4.3.1.2. Bioreactor model

A bioreactor model describing a batch and a fed-batch culture was previously presented (Bélignon et al., 2015) and is extended to continuous reactor in the current work.

The main differences between fed-batch culture and continuous cultures concern the volume variation of the medium  $\frac{dV}{dT}$ , the feed medium flow rate used for continuous culture  $F_{feed}$  and the solution used for pH regulation flow rate  $F_{pH}$  during fed-batch culture.

In batch and fed-batch cultures, the pH is controlled by the addition of an acetic acid solution as previously described (Bélignon et al., 2015). Volume variation in the bioreactor can be described by a set of equations:

$$\begin{cases} \frac{dV}{dT} = F_{pH}(t) \\ F_{pH}(t) = \frac{-R_{H+}}{\frac{S_{Ac feed}}{60}} \\ F_{feed} = 0 \end{cases}$$

**Equation IV-43**

During continuous culture, the volume variation is stable. pH is solely controlled by KOH addition. The KOH addition could be considered as negligible compared to the feed medium addition. The  $F_{feed}$  was kept constant to a value of 0.160 L/h.

The volume variation in the reactor could be described as:

$$\begin{cases} \frac{dV}{dT} = 0 \\ F_{pH}(t) = 0 \\ F_{feed} = 0.160 \end{cases}$$

**Equation IV-44**

The model could be described by the following equations:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{1}{V(t)} (R_X - X \frac{dV}{dt} - F_{\text{feed}}X)$$

Equation IV-45

$$\frac{dS_i}{dt} = \frac{1}{V(t)} \left( R_{S_i} - S_i \frac{dV}{dt} + F_{\text{pH}} S_{i \text{ pH}} + F_{\text{feed}} (S_{i \text{ feed}} - S_i) \right) + K_L a (S_i^* - S_i)$$

Equation IV-46

The first equation described the cell mass concentration (X) changes in the reactor. For liquid solute or a dissolved gas compound *i*, its concentration variation in the reactor was described by the second equation. If gas-liquid exchange is considered,  $K_L a$ , being the overall oxygen mass transfer coefficient, and  $S_i^*$ , the dissolved gas concentration in saturation conditions, have to be taken into account.

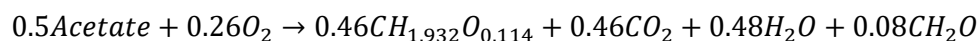
#### 4.3.2. Calibration of the lipid production model by a fed-batch culture

The growth model of *Cryptococcus curvatus* on acetic acid described in a previous study (Béligon et al., 2015) was completed to take into account the second phase of the process, i.e. lipids accumulation which followed the cell mass production period. The fed-batch culture previously described (Béligon et al., 2015) was used to calibrate the lipid production model.

The fed-batch culture started with a cell mass production phase during which all nutrients were non-limiting. In a second part, the feed medium was changed at the end of cell growth to an acetic acid-rich solution with low amounts of nitrogen allowing an increase in C/N ratio of the medium. A C/N ratio of 300 was first tested leading to a 5.68-fold increase in lipid concentration corresponding to a lipid content of 53%. Monosaccharides were also produced as storage compounds but with lower concentrations, close to 10 g/L. Two other C/N ratios (500 and 900) were then reached by increasing acetic acid concentration. Only slight variations in lipid content were observed, which reached respectively 57% and 60% of the dry cell weight. Even if acetic acid was still consumed during the lipid production phase, a low lipid accumulation was observed once lipid content reached 53% value. However  $\text{CO}_2$  was still produced. This cell metabolic state could therefore be considered as maintenance, corresponding to acetic acid oxidation (Béligon et al., 2015).

Cell mass concentration, mol fraction of carbon dioxide in the gas phase  $y_{\text{CO}_2}$ , lipids and monosaccharides concentration obtained during the culture were used for the calibration of the model in order to fit the experimental data to the model predictions. The experimental cell mass concentration values were the sum of non-lipid cell mass, lipids and monosaccharides.

According to the mass balance analysis of the culture, the stoichiometric equation describing lipid formation could be written as:

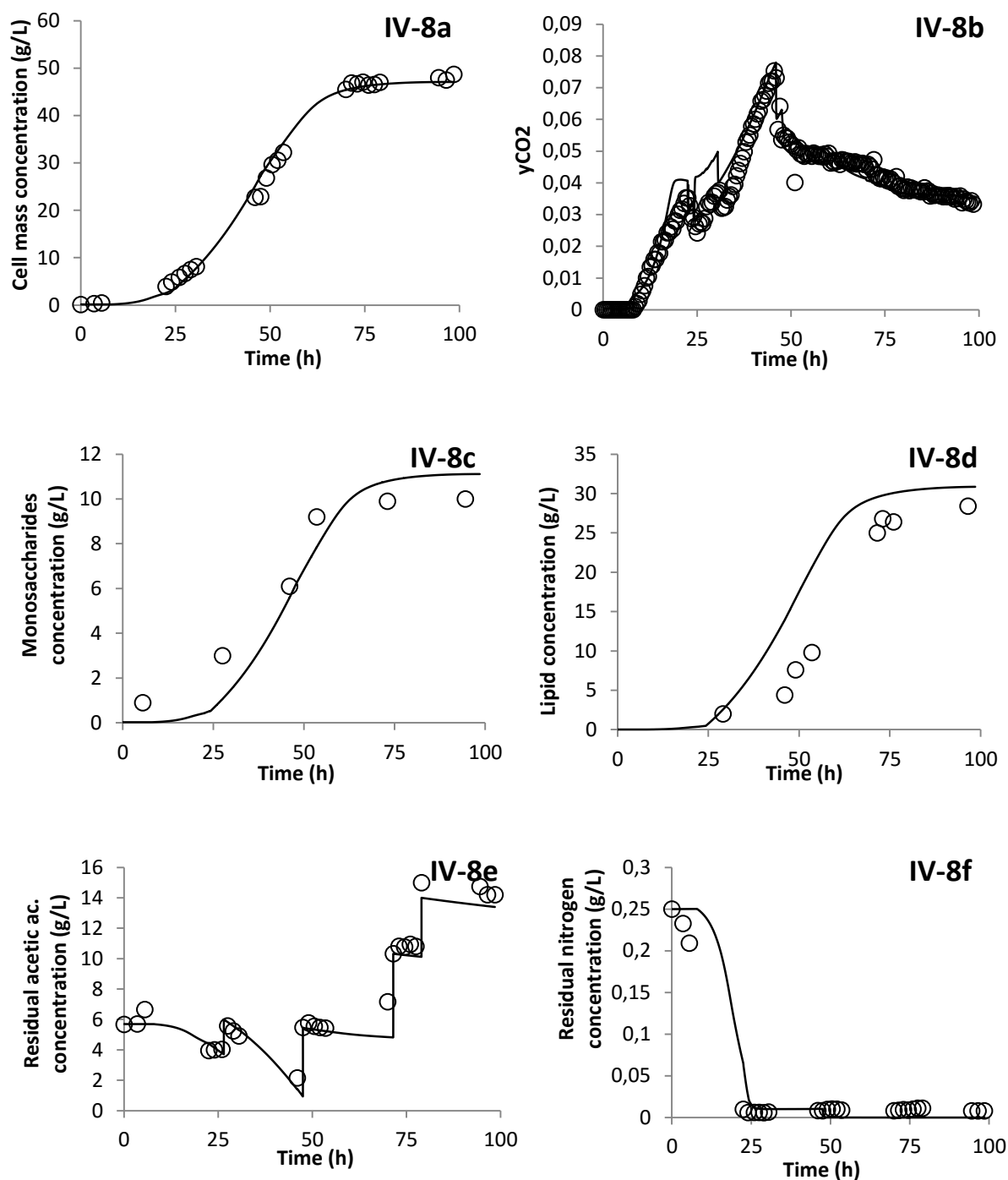


Equation IV-47

To fit the experimental data, the lipid formation rate B was set at  $0.14 \text{ g}_L \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Inflexion point  $I_1$  beyond which lipid production started was calculated as 0.3. During the maintenance phase of the culture, the maintenance term m was set at  $0.2 \text{ g}_{\text{acetic acid}} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . The inflexion point  $I_2$ , corresponding to the lipid content when lipid production stopped and the  $CO_2$  became the only product observed, was set at 53%.

Comparison between experimental data and model predictions were presented in Figure IV-8. Cell mass concentration,  $CO_2$  molar fractions of air  $y_{CO_2}$  and monosaccharides concentrations were well fitted by the model with root mean square deviations of respectively 2.25,  $3.94 \cdot 10^{-5}$  and 1.45 (Figures IV-8a, IV-8b and IV-8c). The model revealed that the monosaccharides production might start before the lipid production; however this hypothesis remained to be confirmed. Lipid concentrations obtained during the culture were compared to the model predictions in Figure IV-7d. The experimental data were well fitted by the prediction model with a root mean square deviation of 42.34. Residual acetic acid and ammonium concentrations obtained during the culture remained close to the values expected, the root mean square deviations associated were calculated as, respectively, 3.45 and  $2.74 \cdot 10^{-4}$  (Figure IV-8e, Figure IV-8f).

This numerical model developed for growth and lipid production appeared to be consistent with the experimental data obtained for this fed-batch culture. It could therefore be considered as calibrated and validated by this experimental culture. This model could be used as a predictive tool to simulate cultures and to identify optimal parameters for lipid production.



**Figure IV- 8. Comparison of values obtained from a fed-batch culture of *C. curvatus* on acetic acid and predictions.**

Values predicted by the model were represented by a black line (-) and experimental data by a clear circle (o). (8a) Cell mass concentration (8b)  $y_{CO_2}$  (8c) Monosaccharides concentration (8d) Lipid concentrations (8e) Residual acetic acid concentration (8f) Residual nitrogen concentration.

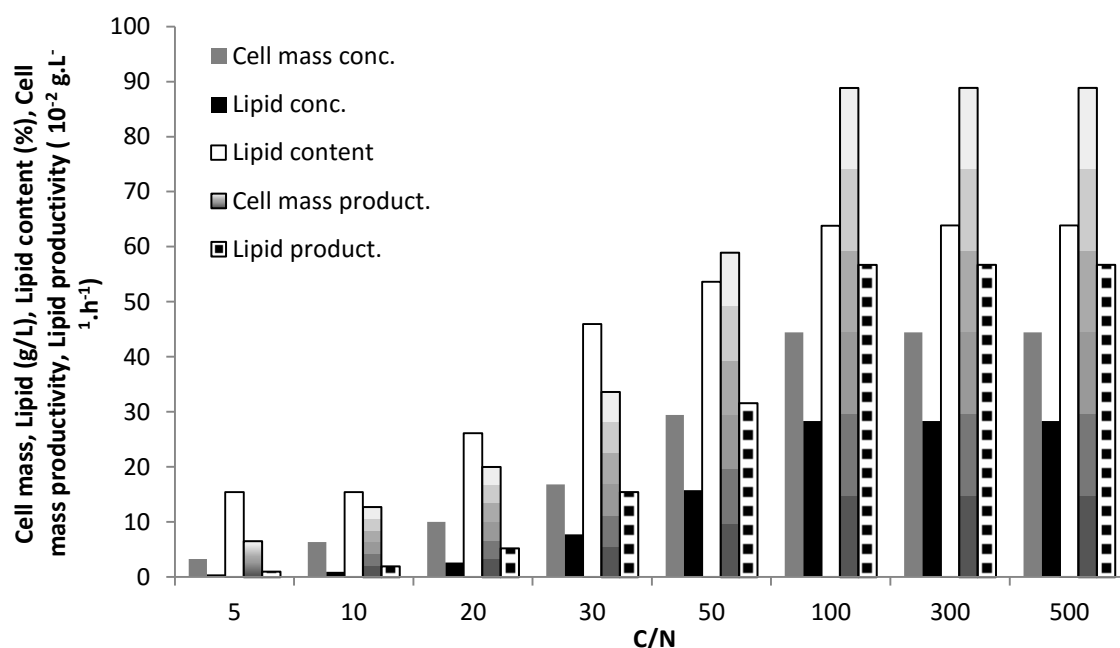
#### ***4.3.3. Determination of continuous culture parameters of the oleaginous yeast *C. curvatus* for cell mass and lipid production***

The model developed for fed-batch culture was used to simulate continuous culture mode which is considered in the concept described in the Background part. Acetic acid was used as model substrate for VFAs. In this case using a predictive model could be an efficient tool to rapidly identify process parameters such as C/N ratio or dilution rate leading to the most interesting lipid and cell mass production since experimental continuous cultures require important amounts of substrate and time.

##### ***4.3.3.1. Numerical identification of the most suitable C/N ratio for growth and lipid production in continuous culture***

In a first step, the most suitable C/N ratio for growth and lipid production by the oleaginous yeast *C. curvatus* in a chemostat was determined. Since the composition of the feed medium could modify the metabolic behavior of the yeast, continuous cultures exhibiting feed medium containing different C/N ratios (ranging from 5 to 500) were simulated. The dilution rate chosen for these simulations was  $0.02\text{ h}^{-1}$  since it was reported that this low dilution rate was the optimal for lipid production (Papanikolaou and Aggelis, 2002). The nitrogen concentration was kept stable and the acetic acid concentration was varied to increase the C/N ratio. Using the same ammonium concentration ensured the maintenance of a basal cell mass production. The carbon excess brought by the feed medium can be assimilated and channeled towards lipid biosynthesis. This system was used to determine the influence of an excess of carbon on the lipid content of a basal cell mass concentration.

The main results of these simulations were represented in Figure IV-9. Cell mass and lipid concentrations, lipid content and cell mass and lipid productivities were determined for each C/N ratio tested. The increase in acetic acid concentration led to an increase in all other variables. When the feed medium used for simulations exhibited a C/N higher than 50, no significant variations were observed between the measured values. The maximal values were obtained for cultures performed using a feed medium with a C/N ratio of 100 and above. However, an acetic acid loss was observed in the output when these high C/N ratios were used despite an increase in  $K_La$  value. Even if interesting values of productivities and concentrations were reported, a waste of substrate could be obtained with these high C/N ratios. Using a feed medium with lower C/N ratio (such as 50) ensured substrate exhaustion and the release of a VFAs free medium.



**Figure IV-9. Influence of the C/N ratio on chemostat results, obtained from simulations.**

The nitrogen concentration was set to 0.8 g/L. C/N ratio varied from 5 to 500 with the acetic acid concentrations ranging from 10 to 1000 g/L. For the simulations,  $K_La$  values were set to 300 h<sup>-1</sup> for C/N ratios ranging from 5 to 50 and to 700 h<sup>-1</sup> for C/N ratios from 100 and above.

For the yeast growth, low C/N ratios are usually employed. The basal cell lipid content achieved when all nutrients are present in non limiting concentrations in the culture medium varies between 15 to 20% (Beopoulos et al., 2009). Feed medium presenting C/N ratios of 5 and 10 allowed obtaining this result. A C/N ratio of 10 led to better cell mass concentration and productivity, respectively 6.37 g/L and 0.13 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> for a dilution rate of 0.02 h<sup>-1</sup>.

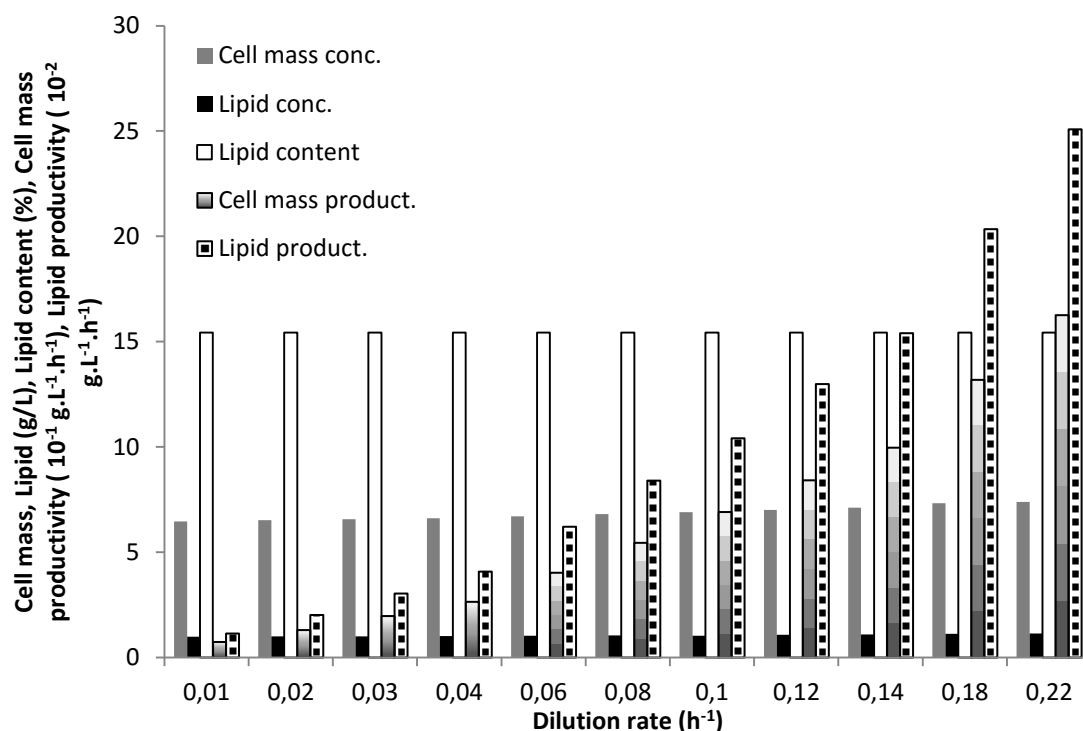
For lipid production, lipid concentrations and productivities were enhanced when the feed medium presented a C/N ratio of 50. Lipid concentration, lipid content and lipid productivity were respectively predicted to be 17.02 g/L, 58.19% and 0.34 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

For the upcoming simulations, feed media exhibiting C/N ratios of 10 for cell mass production and 50 for lipid production were used.

#### 4.3.3.2. Identification of the most suitable dilution rate

The dilution rate previously used for simulation was 0.02 h<sup>-1</sup>. To verify if this dilution rate was the optimal for cultivation of yeasts on acetic acid, different continuous cultures were simulated using a range of dilution rates (from 0.01 to 0.22 h<sup>-1</sup>). The C/N ratios of 10 and 50 were tested.

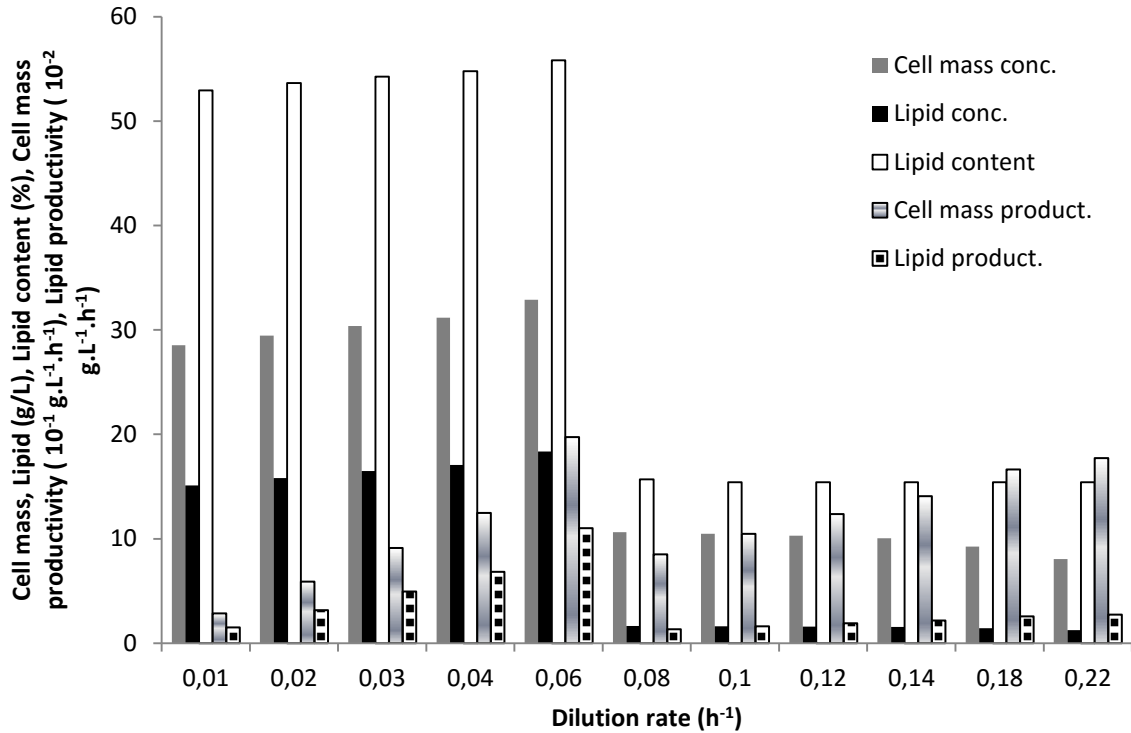
The main results of the simulations using a C/N 10 feed medium were presented in Figure IV-10. An increase in the dilution rate led to slight increases in cell mass concentration and lipid concentration, however lipid content remained constant at 15.43% in all cases. Cell mass and lipid productivities increased with the increase of dilution rate. These first results revealed that, with a feed medium exhibiting a C/N ratio of 10, growth of the yeast could be achieved whichever dilution rate was chosen among the tested range.



**Figure IV-10. Influence of the dilution rate on chemostat results, obtained from simulations.**

The feed medium used for these simulations exhibiting a C/N ratio of 10 was used. For the simulations,  $K_L a$  values were set to  $300 h^{-1}$ .

Results of the simulations using a C/N 50 feed medium were presented in Figure IV-11. Cell mass and lipid concentrations and lipid content increased until a dilution rate of  $0.06 \text{ h}^{-1}$  and decreased since then. The same trends were observed for cell mass and lipid productivities. It was interesting to notice that cell mass and lipid productivities started to increase again from a dilution rate of  $0.10 \text{ h}^{-1}$ .



**Figure IV-11. Influence of the dilution rate on chemostat results, obtained from simulations.**

The feed medium used for these simulations exhibiting a C/N ratio of 50 was used. For the simulations,  $K_{La}$  values were set to  $300 \text{ h}^{-1}$  dilution rates ranging from  $0.01$  to  $0.04 \text{ h}^{-1}$  and above  $500 \text{ h}^{-1}$  for dilution rates from  $0.06 \text{ h}^{-1}$  and above.

Above a dilution rate of  $0.04 \text{ h}^{-1}$ , a release of acetic acid was observed in the outlet and an increase in  $K_{La}$  value to  $500 \text{ h}^{-1}$  was necessary to simulate the total consumption of acetic acid. This culture condition could be technically difficult to be practically achieved during a chemostat culture.

The dilution rate of  $0.06 \text{ h}^{-1}$  led to the highest values of cell mass and lipid concentrations and lipid content. However, to avoid a waste of substrate, the use of a lower dilution rate such as  $0.04 \text{ h}^{-1}$  seemed to be the most appropriate for lipid production. This dilution rate allowed obtaining, at steady-state, cell mass and lipid concentrations and lipid content of, respectively,  $31.18 \text{ g/L}$ ,  $17.08 \text{ g/L}$  and  $54.78\%$ . Cell mass and lipid productivities were also interesting since they were predicted to be superior to numerous values of productivities reported in the literature (Table IV-6), respectively  $1.25 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  and  $0.68 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .



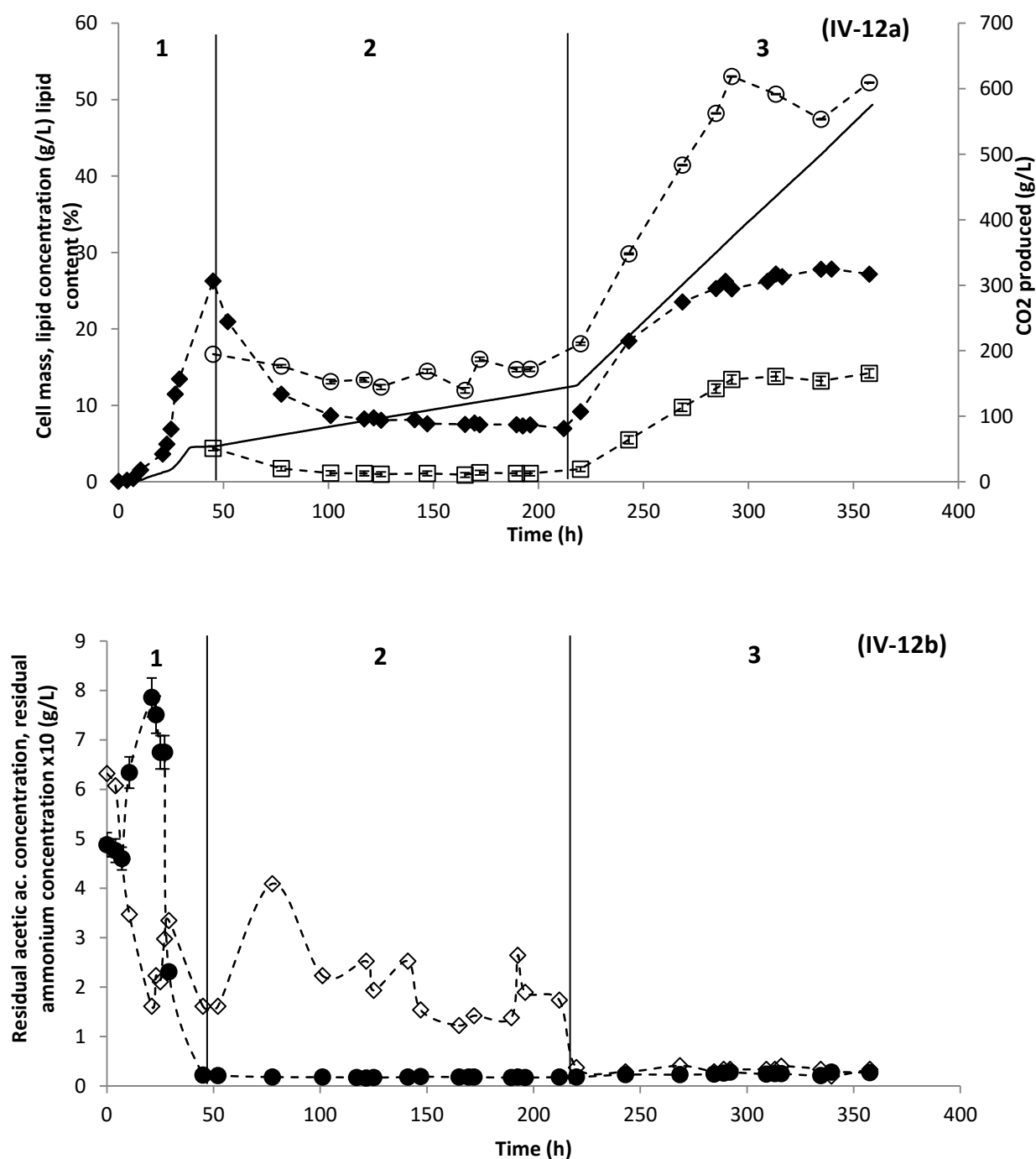
To validate these results, a continuous culture of the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* using acetic acid as carbon source was performed using a C/N ratio of 10 in the feed medium for the growth phase then a C/N ratio of 50 for lipid accumulation with a dilution rate of  $0.04\text{ h}^{-1}$ . The carbon and nitrogen concentrations of the feed media were the same as those used in the simulations for the corresponding C/N ratios (section 4.3.3.1.)

#### **4.3.4. Continuous culture of *C. curvatus* on acetic acid**

##### **4.3.4.1. Growth phase**

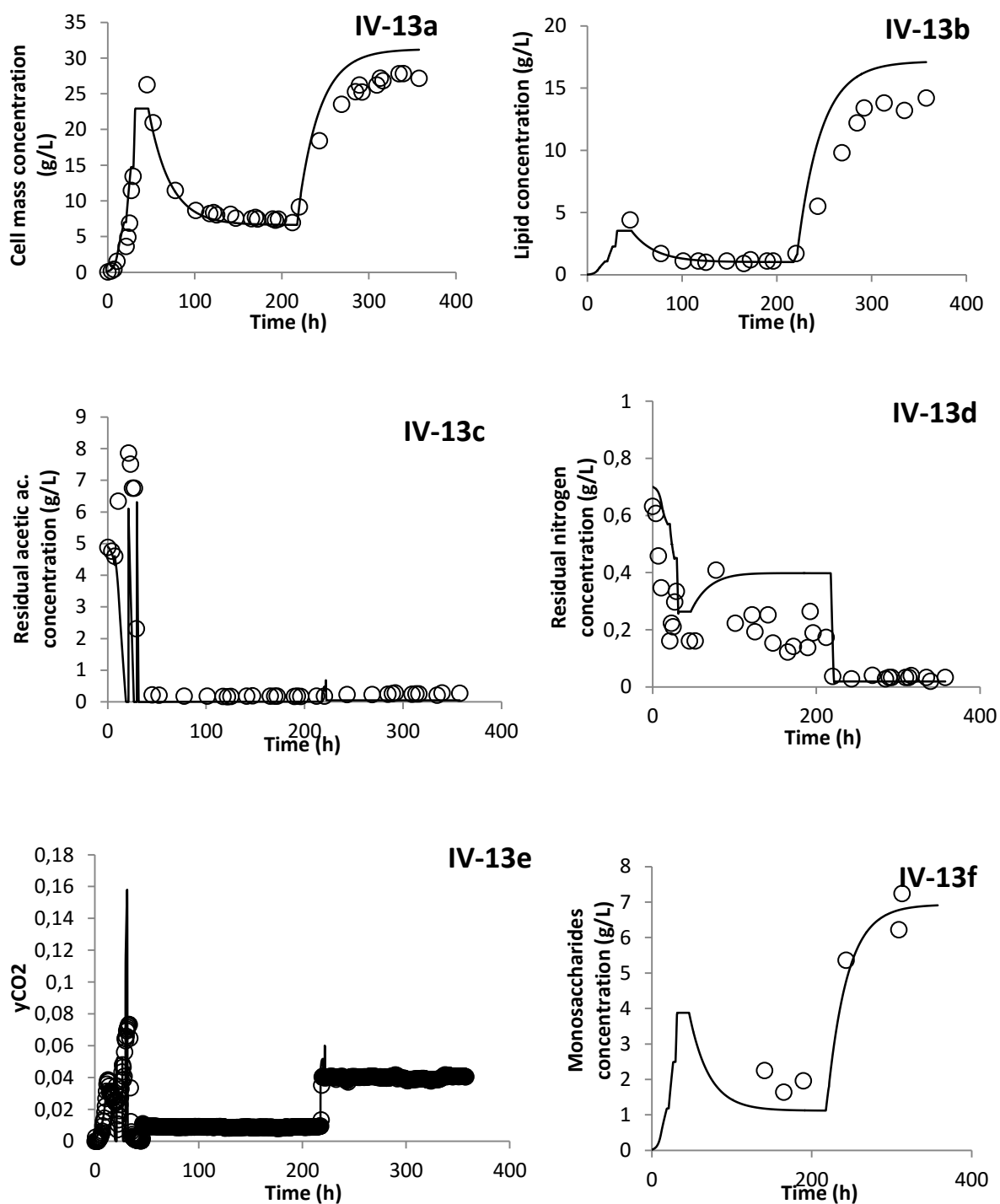
The results of the continuous culture were presented in Figure IV-12. The yeast culture started with a cell mass production phase (phase 1, Figure IV-12) using the pH regulation system previously presented (Béligon et al., 2015). A peristaltic pump allowed a continuous and homogenous withdrawal of the culture medium. At the 46<sup>th</sup> hour of culture, the feed medium was brought to the reactor to start the continuous phase (phase 2, Figure IV-12). The feed medium, presenting a C/N ratio of 10, was tested in order to ensure that yeast growth on acetic acid using a continuous mode was possible. This low C/N ratio promoted yeast growth without any lipid accumulation.

Steady state was reached after three residence times. During the transitory phase, cell mass concentration decreased and lipid content remained stable around 15%. At steady-state, a stable cell mass concentration of 7.7 g/L was obtained, containing a lipid content varying between 12 and 16%. These low lipid contents was consistent with the expected value in non-limiting conditions (Beopoulos et al., 2009), confirming that the intracellular lipids produced might be mainly structural lipids, such as membranes. Figure IV-13 presented comparison of cell mass (Figure IV-13a) and lipid concentrations (Figure IV-13b) experimental data and model predictions. During the growth phase and the first part of the continuous culture, the experimental data fitted the model predictions.



**Figure IV-12. Results of a continuous cultivation of *Cryptococcus curvatus* in a 7-L fermenter.**

(IV-12a) Time course of dry cell weight (DCW)(♦), lipid concentration (□), lipid content (○) and CO<sub>2</sub> production (-) (IV-12b) Time course of residual acetic acid (●) and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration (◇). A dilution rate of 0.04 h<sup>-1</sup> was used. From 0 to 46 hours (phase 1), yeasts were grown on acetic acid, using the pH regulation system previously described. pH was set at 7.0, temperature was set at 30°C. From 46 to 217 hours, the continuous phase was alimented by a feed medium presenting a C/N ratio of 10 for cell mass production (phase 2). From 217 hours to the end of the culture, a feed medium presenting a C/N ratio of 50 (phase 3) was brought to the medium to promote lipid production. The same nitrogen concentration was used for both feed media, the carbon concentration was increased to induce lipid accumulation.



**Figure IV-13.** Comparison of the values from a continuous culture of *C. curvatus* on acetic acid and predictions.

A dilution rate of  $0.04 \text{ h}^{-1}$  was used. Values predicted by the model were represented by a black line (-) and experimental data by a clear circle (o). (13a) Cell mass concentration (13b) Lipid concentration (13c) Residual acetic acid concentration (13d) Residual nitrogen concentration (13e)  $y_{CO2}$  (13f) Monosaccharides concentration.

During this phase, specific lipid formation rate  $q_L$  was determined to  $0.005 \text{ g}_L \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Residual acetic acid concentration varied between 0.16 and 0.19 g/L and a specific acetic acid uptake rate  $q_s$  of  $0.104 \text{ g}_{\text{acetic acid}} \cdot \text{g}_{\text{cell mass}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  was determined. Remaining ammonium concentration was maintained close to 0.20 g/L. Acetic acid (Figure IV-13c) and nitrogen (Figure IV-13d) concentration were also well predicted by the model.

During this cell production step, cell mass and lipid yields were evaluated to, respectively, 0.385 g/g and 0.05 g/g (from Table IV-5). This cell mass yield value was similar to the one reported for *R. toruloides* grown on glucose, using a similar dilution rate of  $0.04 \text{ h}^{-1}$  and a C/N ratio of 5 for the feed medium (Shen et al., 2013). Cell mass and lipid productivities were determined to be, respectively,  $0.308 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  and  $0.044 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

This first step confirmed that a continuous cultivation of *C. curvatus* using acetic acid as carbon source was possible.

Tableau IV-5. Cell mass and lipid productivities and yields of oleaginous yeasts grown on various substrates using a fed-batch and a continuous modes

	Yeast strain	Carbon source	Cell mass (g/L)	Lipid (%)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{l/s}$ (g/g)	Cell mass prod. (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Lipid prod. (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Specific lipid prod. (g.g <sub>cell mass</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Reference
Fed-batch	<i>L. starkeyi</i>	Glucose/Xylose	82.4	46.9	0.32	0.15	0.60	0.28		Anschau et al., 2014
	<i>R. glutinis</i>	Glucose	110	64		0.22	2.2	1.41		Cescut et al., 2014
	<i>R. toruloides</i>	Glucose	106.5	67.5	0.35	0.23	0.79	0.54		Li et al., 2007
	<i>C. curvatus</i>	Acetic ac.	168	75			1.11	0.66		Chi et al., 2011
	<i>C. curvatus</i>	Glycerol	118	25	0.40	0.11	2.36	0.59		Meesters et al., 1996
	<i>C. curvatus</i>	Glucose/Acetic ac	30.8	40.7	0.32	0.13	0.40	0.16		Fontanille et al., 2012
	<i>C. curvatus</i>	Glucose/Acetic ac	13.5	50.9	0.30	0.15	0.27	0.14		Christophe et al., 2012
	<i>C. curvatus</i>	VFAs	2.8	37.2			0.05	0.02		Zheng et al., 2012
	<i>C. curvatus</i>	VFAs	2.60	50.4	0.28	0.13	0.04	0.02		Xu et al., 2015
	<i>C. curvatus</i>	Acetic ac.	48.7	60	0.36	0.18	0.49	0.31		Béligon et al., 2015
Continuous	<i>Y. lipolytica</i> <sup>b</sup>	Glycerol	8.1	43	0.20	0.08	0.24	0.11	0.013	Papanikolaou and Aggelis, 2002
	<i>C. albidus</i> <sup>e</sup>	VFAs	1.0	29.9	0.18		0.014	0.004	0.004	Vajpeyi and Chandran, 2015
	<i>L. starkeyi</i> <sup>b</sup>	Glucose/Xylose	13.3	48.4	0.44	0.24	0.40	0.21	0.014	Anschau et al., 2014
	<i>L. starkeyi</i> <sup>b</sup>	Hemicellulose hydrolysate	13.9	26.7	0.67	0.22	0.42	0.11	0.008	Anschau et al., 2014
	<i>R. toruloides</i> <sup>a</sup>	Glucose	5.3	8.70	0.40		0.20		0.003	Shen et al., 2013
	<i>R. toruloides</i> <sup>a</sup>	Glucose	5.72	53.1	0.33	0.18	0.23	0.12	0.021	Shen et al., 2013
	<i>C. curvatus</i> <sup>d</sup>	Glucose	13.5	29	0.45	0.13	0.54	0.16	0.023	Evans and Ratledge, 1983
	<i>C. curvatus</i> <sup>c</sup>	Hydrogen production effluent	9.1-9.9	13-14	0.48-0.51		0.34	0.05	0.0005	Chi et al., 2011
	<i>C. curvatus</i> <sup>a</sup>	Acetic ac.	7.7	12-16	0.39	0.05	0.31	0.04	0.005	Phase 2, this study
	<i>C. curvatus</i> <sup>a</sup>	Acetic ac.	26.7	48-53	0.27	0.13	1.07	0.54	0.021	Phase 3, this study

<sup>a</sup> D = 0.04 h<sup>-1</sup> – <sup>b</sup> D = 0.03 h<sup>-1</sup> – <sup>c</sup> D = 0.036 h<sup>-1</sup> – <sup>d</sup> D = 0.08 h<sup>-1</sup> – <sup>e</sup> D = 0.014 h<sup>-1</sup>.

#### 4.3.4.2. Lipid production phase

For lipid production on a continuous mode, a second feed medium was tested (phase 3, Figure IV-12). Its nitrogen concentration was similar to the previous one used in section 4.4.1., but its carbon concentration was increased to a final C/N ratio of 50. Ykema et al. (Ykema et al., 1988) have reported that, during a continuous culture, C/N ratios comprised between 30 and 70 caused an increase of the lipid content of *Apiotrichum curvatum* grown on wheypermeate.

The second feed medium was brought to the reactor from the 217<sup>th</sup> hour of culture and steady state was reached at the 284<sup>th</sup> hour. During the transitory phase, cell mass concentration increased and then stabilized around 26.7 g/L. These experimental values were close to those predicted by the model (Figure IV-13a). At the same time, lipid content increased from nearly 15 % to a value comprised between 48 and 53 %. Lipid concentration remained stable around 12 and 14 g/L. These values were slightly inferior to those predicted by the model which reported a lipid concentration of nearly 17 g/L (Figure IV-13b). The specific lipid formation rate  $q_L$  increased to a maximal value of  $0.021 \text{ g}_L \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

During this phase, the specific substrate uptake rate  $q_s$  was increased to  $0.150 \text{ g}_{\text{acetic acid}} \cdot \text{g}_{\text{cell mass}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Residual acetic acid concentration was close to 0.19 g/L while remaining ammonium concentration varied between 0.02 and 0.05 g/L. These residual acetic acid and nitrogen concentrations fitted the model data (Figures IV-13c and IV-13d).

In comparison to the first cell production step (C/N 10), cell mass yield decreased from 0.385 to 0.267 g/g. Lipid yield increased from 0.05 g/g to 0.134 g/g. These values indicated that in these conditions of high C/N, the yeast metabolism was more oriented towards lipid accumulation while cell proliferation was slowed down.

Cell mass and lipid productivities both increased to, respectively, 1.068 and  $0.544 \text{ g}_L \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . These values were close to those announced by the model predictions. These values were also significantly higher than those reported by Shen et al. (Shen et al., 2013) and Anschau et al. (Anschau et al., 2014) for the cultivations of, respectively, *R. toruloides* and *L. starkeyi* grown on classical sugars substrates, at similar dilution rate. It was also interesting to notice that this high cell mass productivity obtained with a continuous mode was comparable to values reported in the literature for fed-batch cultures (Table IV-5).

The lipid productivity obtained at steady state during continuous culture was higher than the lipid productivities of continuous cultures reported in the literature (Table IV-5). This result was clearly interesting since an important quantity of lipids could be produced with acetic acid as carbon source as long as the continuous culture was alimented. It was also similar to values obtained from fed-batch culture of *R. toruloides* grown on glucose (Li et al., 2007). These productivity results should be tempered by the fact that the carbon and nitrogen sources concentrations in the feed medium used were higher compared to those employed in the continuous cultures presented in Table IV-6. As a consequence, final cell mass and lipid concentrations were superior to those reported in the literature. To be appropriately compared, specific lipid productivities of each work presented were determined (Table IV-6).

The specific lipid productivity obtained from the lipid production phase was of  $0.021 \text{ g}_L \cdot \text{g}_{\text{cell mass}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . This value was close to those obtained from continuous cultures of *R. toruloides* and *C. curvatus* both realized using a simple sugar, glucose, as substrate (Evans and Ratledge, 1983; Shen et al., 2013). It was also the highest ever reported in the literature on acetic acid.

Lipid content obtained from fed-batch and continuous cultures were quite similar, meaning yeast metabolism could be directed toward lipid production whichever culture mode was employed. This information is really interesting since the final project is meant to be run in a continuous mode. High lipid content, similar to those obtained from fed-batch culture, should be achievable using this culture mode.

Cell mass and lipid yields from fed-batch culture were higher than those obtained from continuous culture. This pointed that the substrate was more efficiently utilized for cell mass and lipid synthesis during the fed-batch culture. Yield is a key criterion for the choice of the culture mode when the substrate cost is of crucial importance. Continuous culture parameters should therefore be modified in order to increase the final yields.

#### **4.3.5. Fatty acids profile of lipids obtained the continuous culture**

The fatty acid composition of the lipids produced by continuous cultures of *C. curvatus* was determined by GC analysis after a transesterification step (Table IV-6). The main fatty acids produced were palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), palmitoleic acid (C16:1), oleic acid (C18:1) and linoleic acid (C18:2). Close fatty acid composition were reported for, respectively, *C. albidus* and *C. curvatus* grown on various VFAs (Chi et al., 2011; Fei et al., 2011). Christophe et al. (Christophe et al., 2012) reported the presence of linolenic acid in *C. curvatus* oil, which was not observed in this study. This

fatty acid composition was quite similar to that of vegetable oils, which were used for the industrial production of biodiesel (Mba et al., 2015).

It should be pointed out that no significant differences for lipid profiles were observed in function of the culture mode. Papanikolaou and Aggelis (Papanikolaou and Aggelis, 2002) also reported similar fatty acid composition between lipids extracted from batch and continuous cultures of *Y. lipolytica* grown on glycerol. The culture mode did not seem to have an influence on the final product composition.

#### **4.4. Conclusions**

A model was designed to predict the lipid production of the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* grown on acetic acid. The model was calibrated and validated using a fed-batch culture previously presented (Béligon et al., 2015). Thanks to this model, simulations of continuous cultures could be realized. Results revealed that a dilution rate of  $0.04\text{ h}^{-1}$  and a feed medium exhibiting a C/N ratio of 50 improved cell mass and lipid concentrations and productivities without any VFA release. A continuous culture of *Cryptococcus curvatus* on acetic acid was then launched using these parameters. High cell mass and lipid productivities were obtained, respectively  $1.07$  and  $0.54\text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . These values were superior to those reported in the literature for continuous cultures. The experimental data fitted the model predictions. It confirmed that the use of a predictive model is a powerful tool which could help the operator to identify in less time parameters improving the culture. These results also confirmed that the lipid production step of the two-stage bioprocess designed for lignocellulosic cell mass valorization into biofuels could be run continuously.

#### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

#### **Acknowledgments**

This work was carried out in the framework of the Laboratory of Excellence IMobs3. David Duchez and Agnès Pons are gratefully acknowledged for their help.



Tableau IV-6. Comparison of fatty acids profiles of microbial and vegetable oils.

	Species	Substrate	Palmitic acid (C16:0)	Palmitoleic acid (C16:1)	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Linolenic acid (C18 :3)	Reference
Fed-batch	<i>C. curvatus</i>	Acetic acid	18.4	Traces	22.2	49.5	9	0.6	Béligon et al., 2015
	<i>C. albidus</i>	VFAs	16.1	-	5.14	17.7	61.1	Traces	Fei et al., 2011
	<i>C. curvatus</i>	Glucose/Acetic acid	24	-	13	33	18	9	Christophe et al., 2012
	<i>C. curvatus</i>	Acetic acid	17.2	0.2	19	46.2	12.7	1.6	Chi et al., 2011
Continuous	<i>C. curvatus</i>	Acetic acid	19	Traces	25.3	47.7	7.8	-	Phase 2, this study
	<i>C. curvatus</i>	Acetic acid	13.5	0	26.9	51.4	8.2	-	Phase 3, this study
	<i>Y. lipolytica</i>	Glycerol	15	-	13	47	21	-	Papanikolaou and Aggelis, 2002
	<i>L. starkeyi</i>	Glucose/Xylose	33.5	-	16.1	48.3	2	-	Anschau et al., 2014
	Palm oil		44	0.1	4.5	39.2	10.1	0.4	Mba et al., 2015

## 5. DISCUSSION

### 5.1. Résultats principaux obtenus au cours du Chapitre IV

#### ***5.1.1. Simulations de cultures continues et identification de paramètres opératoires influençant la production de lipides***

Un modèle de croissance et de production de lipides a été mis au point. Il a été utilisé comme outil de simulation de cultures continues et pour l'identification de taux de dilution et de rapports C/N de la solution d'alimentation permettant d'obtenir des valeurs de productivités en biomasse et lipides intéressantes. Pour l'identification des rapports C/N optimaux des solutions d'alimentation, la démarche adoptée dans ce travail a été de fixer la concentration en azote et de faire varier la concentration en acétate afin d'augmenter le rapport C/N. Ce système nous permet d'obtenir une concentration en biomasse active basale à laquelle s'ajoute une teneur en lipides qui varie selon le rapport C/N imposé.

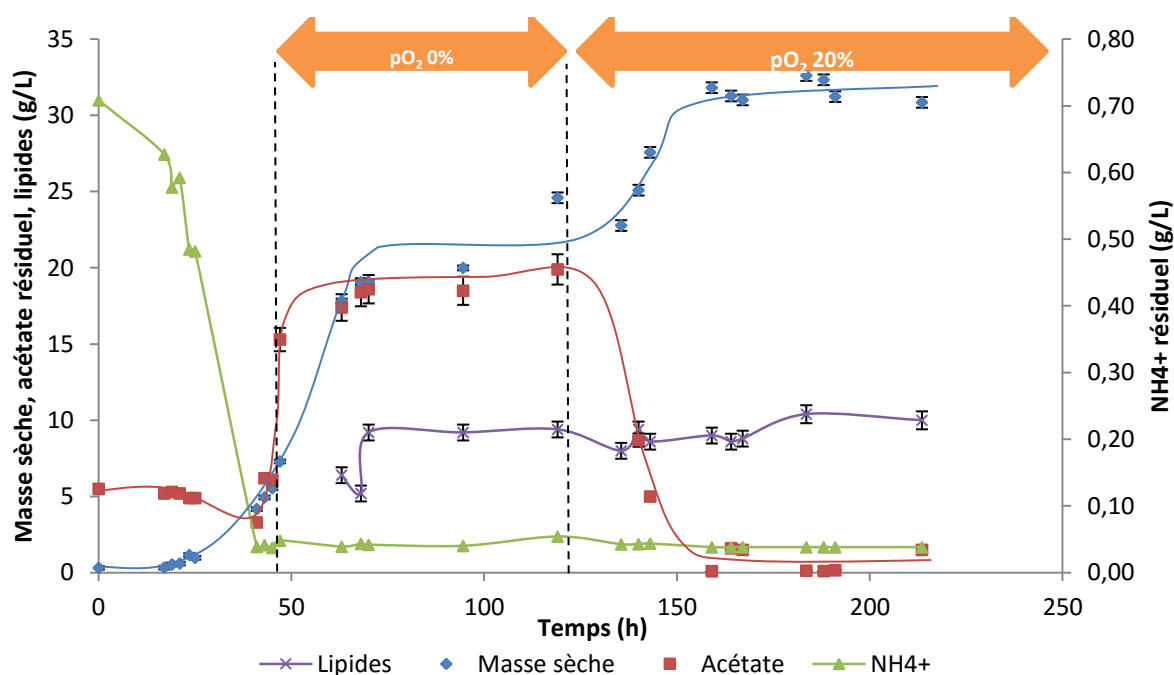
Par ce biais, un taux de dilution de  $0,04 \text{ h}^{-1}$  ainsi qu'un milieu d'alimentation présentant un rapport C/N de 50 ont été identifiés comme étant des paramètres cruciaux afin de produire une concentration en biomasse élevée comprenant une teneur en lipides proche de 50%. Une culture continue de la levure *C. curvatus* cultivée sur acétate a ainsi pu montrer qu'à un taux de dilution de  $0,04 \text{ h}^{-1}$ , la productivité en lipides est évaluée à  $0,54 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Cette valeur est supérieure aux valeurs reportées dans la littérature pour des cultures continues de levures effectuées sur des substrats simples (glucose, glycérol) (Papanikolaou and Aggelis, 2002; Shen et al., 2013) ou plus complexes (AGVs, hydrolysats d'hémicellulose) (Anschau et al., 2014; Vajpeyi and Chandran, 2015) mais également proche des performances atteintes par certaines cultures en fed-batch réalisées sur substrats simples (Li et al., 2007; Meesters et al., 1996).

#### ***5.1.2. Influence d'une limitation par l'oxygène***

La culture continue présentée à la fin de l'article a été réalisée sans limitation par l'oxygène. Cependant, afin de maintenir une  $p\text{O}_2$  de 50% dans le réacteur lorsque la concentration en biomasse atteint de telles valeurs (près de  $30 \text{ g/L}$ ), le coefficient de transfert volumétrique de l'oxygène ( $K_La$ ) doit être maintenu à une valeur très élevée. Nous avons déterminé que pour maintenir la  $p\text{O}_2$  à 50%, la valeur du  $K_La$  était de plus de  $500 \text{ h}^{-1}$ , valeur atteinte lorsque les points de consigne du débit d'aération et de la vitesse d'agitation étaient respectivement de  $2 \text{ L/min}$  et  $1000 \text{ rpm}$ . Bien que techniquement réalisable, le maintien de ces paramètres à de tels débit et vitesse de fonctionnement durant une période prolongée représente un poste de dépense énergétique

important. Nous nous sommes donc intéressés au comportement du système dans des conditions de limitation par l'oxygène.

Une nouvelle culture en continu de *C. curvatus* sur acétate a été réalisée afin d'étudier le comportement de la souche selon différentes conditions d'agitation et d'aération (figure IV-14). Après une première phase de culture en fed-batch destinée à produire de la biomasse, un milieu d'alimentation présentant un rapport C/N de 50 est apporté au réacteur. Le taux de dilution employé est de  $0,04\text{ h}^{-1}$ . Durant cette phase, les conditions d'agitation (800 rpm) et d'aération (0,8 L/min) ont été choisies de manière à avoir une  $pO_2$  à 0%. Lors d'une troisième phase, les conditions d'agitation et d'aération ont été modifiées afin d'augmenter la  $pO_2$  à 20%. Les principales valeurs obtenues dans ces conditions sont présentées dans le tableau IV-7 et comparées à celles obtenues sans limitation ( $pO_2$  50%).



**Figure IV-14. Suivi d'une culture en continu de la levure *C. curvatus* à partir d'acétate.**

De 0 à 46h : phase de fed-batch selon les conditions décrites dans le chapitre III. De 46 à 119h, un milieu d'alimentation au C/N de 50 est apporté au milieu de culture. Les conditions d'agitation et d'aération sont respectivement de 800 rpm et 0,8 L/min pour imposer une limitation par l'oxygène. A partir de 119h, le débit d'aération est fixé à 1 L/min et l'agitation à 1000 rpm pour maintenir la  $pO_2$  à 20%. Le pH est maintenu à 7 durant toute la culture. Le taux de dilution employé est  $0,04\text{ h}^{-1}$ .

L'influence de la limitation par l'oxygène ( $pO_2 = 0\%$ ) se traduit classiquement par une diminution de la production de biomasse associée à une augmentation de la concentration en acétate dans le milieu.

Une diminution de la teneur en lipides de la biomasse est également observée dans ces conditions comparativement à des conditions d'aération non limitantes (40% de lipides vs 50%). Quand la  $pO_2$  augmente significativement, l'augmentation du pourcentage de lipides intracellulaires semble principalement due à une meilleure régénération des cofacteurs  $NAD^+$  et FAD qui sont alors de nouveau disponibles dans le cycle de Krebs pour la fourniture des intermédiaires moléculaires essentiels à la synthèse de lipides.

Les résultats les plus surprenants sont ceux obtenus lors de l'augmentation de la  $pO_2$  de 0 à 20%. En effet, une augmentation significative de la biomasse est observée mais elle est, cette fois, couplée à une diminution importante de la teneur intracellulaire en lipides (30% de lipides vs 40%). Ce phénomène semble indiquer que la réponse métabolique induite par la levée de la limitation par l' $O_2$  est de privilégier au maximum la synthèse de biomasse et non l'accumulation de lipides. Ce n'est qu'à des  $pO_2$  plus importantes que la synthèse de lipides semble être privilégiée par rapport à la synthèse cellulaire (Tableau IV-7). Ces hypothèses devront être confirmées par des expériences complémentaires.

**Tableau IV-7. Comparaison des résultats obtenus suite à l'application d'une limitation par l'oxygène.**

Conditions expérimentales		Limitation par l'oxygène $pO_2$ 0%	Limitation azotée $pO_2$ 20%	Limitation azotée $pO_2$ 50%
Référence		Figure IV-17		Figure IV-12
Concentration en biomasse (g/L)		21,1	31,6	26,7
Concentration en lipides (g/L)		8,2	9,4	13,7
Teneur en lipides (%)		38,9	29,6	51,3
$Y_{X/S}$ (g/g)		0,26	0,32	0,27
$Y_{L/S}$ (g/g)		0,10	0,09	0,13
$Y_{CO_2/S}$ (g/g)		0,66	0,64	0,63
$P_X$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )		0,84	1,26	1,07
$P_L$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )		0,33	0,37	0,54
$q_L$ (g.g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )		0,016	0,012	0,021
$q_{xf}$ (g.g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )		0,024	0,028	0,019
Profils d'acides gras	C16:0	24,7	21,2	13,5
	C16:1	0	0	Traces
	C18:0	34,1	12,8	25,3
	C18:1	34,4	47,5	47,7
	C18:2	6,4	18,2	7,8

$P_X$  : productivité volumique horaire en biomasse –  $P_L$  : productivité volumique horaire en lipides –  $q_L$  : productivité spécifique en lipides –  $q_{xf}$  : productivité spécifique en biomasse active

La limitation par l'oxygène a également un impact sur le profil d'acides gras des lipides. En effet, l'oxygène intervient lors des phénomènes de désaturation durant la biosynthèse des lipides. La désaturase  $\Delta 9$  nécessite une molécule d'oxygène afin de convertir une molécule d'acide stéarique en acide oléique. Par conséquent, si l'oxygène est limitant dans le milieu au cours d'une phase d'accumulation de lipides, alors le degré de saturation des lipides sera d'autant plus élevé. Ce phénomène est observé durant cette culture (tableau IV-7) puisque les proportions en acides gras saturés sont plus importantes lorsque l'oxygène est limitant. Cela a également été observé pour *Rhodotorula gracilis* pour qui la teneur en acides stéarique (C18:0, saturé) et oléique (C18:1, une insaturation) diminue tandis que celle en acide gras polyinsaturés (notamment C18:2 et C18:3) augmente avec une élévation de la concentration en oxygène dissous (Choi et al., 1982). Ces données suggèrent que l'utilisation de la limitation par l'oxygène constitue une façon intéressante de modifier les profils d'acides gras si cet objectif est souhaité.

Ces résultats révèlent que malgré les économies réalisées en termes de dépense énergétique lors d'une diminution des conditions d'agitation et d'aération, une limitation par l'oxygène ne semble pas compatible avec les objectifs fixés. La concentration en lipides ainsi que la productivité volumique horaire en lipides sont significativement moins élevées lorsqu'une limitation par l'oxygène ou un abaissement de l'apport d'oxygène est imposé comparativement à une culture où l'oxygène est apporté de façon non limitante. Le maintien d'une  $pO_2$  élevée devra donc être privilégié.

### 5.3. Comparaison des modes de cultures pour la production de lipides par la levure *C. curvatus* cultivée sur acétate

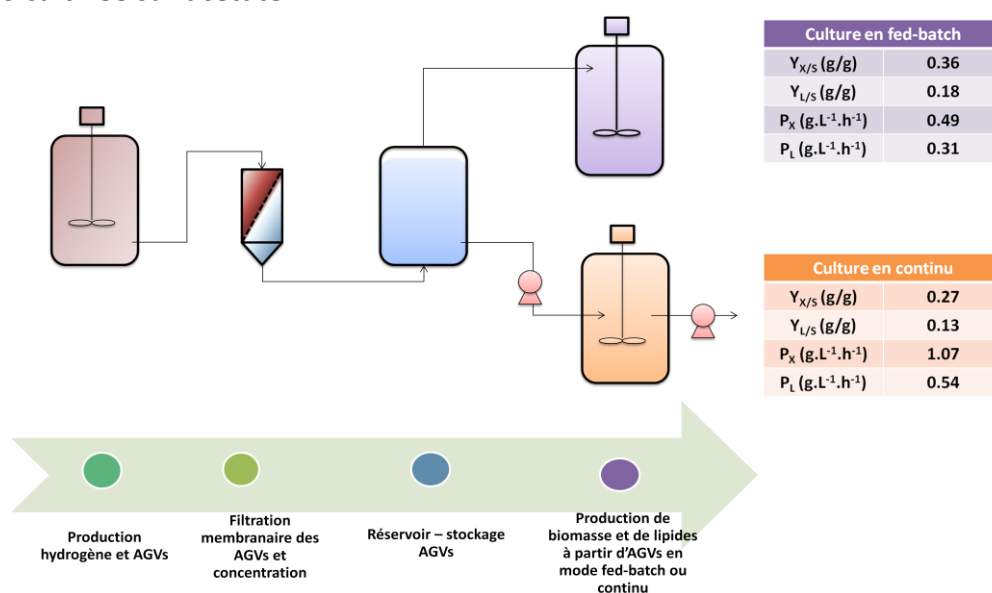
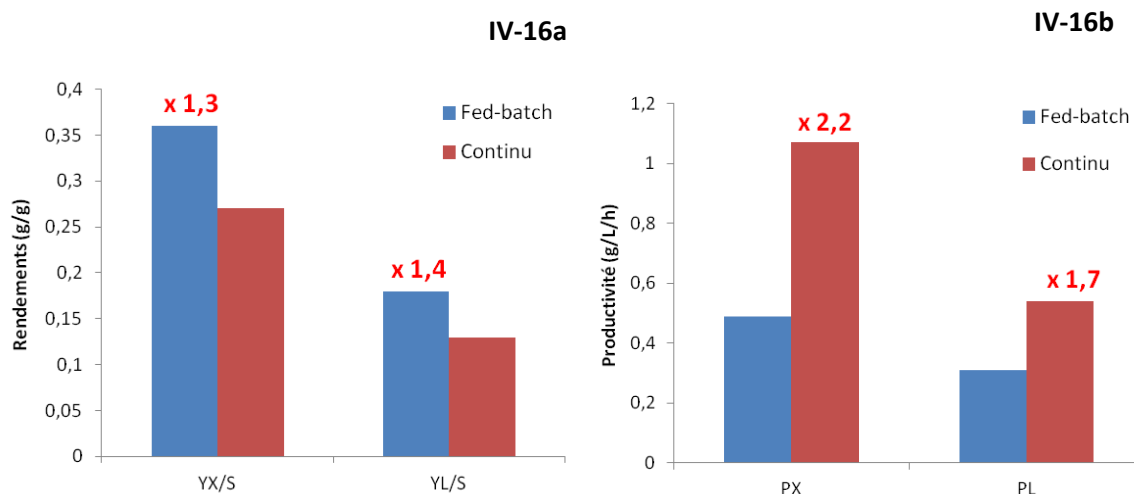


Figure IV- 15. Comparaison des résultats de cultures de levures *C. curvatus* sur acétate selon des modes de culture en continu et discontinu présentées dans les chapitres III et IV.

La figure IV-15 récapitule les principaux résultats obtenus à l'issue de la culture en fed-batch (présentée figure III-11) et de la culture en continu (présentée figure IV-12) de la levure oléagineuse *C. curvatus* à partir d'acétate. Si l'on compare plus finement les rendements  $Y_{X/S}$  et  $Y_{L/S}$  ainsi que les productivités  $P_X$  et  $P_L$  obtenus au cours de ces cultures, deux conclusions se dégagent :

- (i) Les rendements en biomasse et en lipides sont, respectivement, 1,3 et 1,4 fois plus élevés lors de cultures en fed-batch (figure IV-16a). Ceci indique que ce mode de culture permet une conversion plus efficace du substrat en molécule d'intérêt.
- (ii) La culture en continu permet cependant d'obtenir des productivités en biomasse et en lipides élevées, quasiment le double des valeurs obtenues lors de la culture en fed-batch (figure IV-16b). Dans ce cas de figure, une quantité de lipides définie peut être obtenue plus rapidement grâce à ce mode continu tant que la culture est alimentée en substrat, comparativement aux cultures réalisées en mode fed-batch.



**Figure IV-16. Comparaison des rendements (16a) et des productivités volumiques horaire (16b) en biomasse et en lipides de la levure *C. curvatus* cultivée sur acétate en mode fed-batch et continu.**

A partir des données obtenues et dans les conditions opératoires utilisées au cours de ces cultures, nous pouvons estimer le temps et la quantité de substrat nécessaires si l'on désire obtenir l'équivalent du volume de diesel obtenu à partir d'un baril de pétrole, soit 34 L de lipides (afin de produire environ 34 L de biodiesel). Les données ont été calculées pour un réacteur d'un volume utile de 100 m<sup>3</sup> sous réserve que les performances obtenues lors des cultures réalisées en laboratoire (productivités, rendements, déroulement de la culture) soient identiques lors de la montée en échelle. Ceci sous-entend que les réactions se déroulent dans des réacteurs parfaitement agités et homogènes. Il est cependant acquis qu'une variation des valeurs obtenues est attendue lors de

véritables cultures expérimentales à l'échelle industrielle puisque des phénomènes liés à l'extrapolation (hétérogénéité, apparitions de gradients) sont attendus.

Le volume de lipides désiré est équivalent à une quantité de 30 379 g de lipides si l'on se réfère à la densité de l'acide oléique, représentant majeur des acides gras présents (tableaux III-6 et IV-7). Les résultats sont présentés dans la figure IV-17.

La culture continue de *C. curvatus* à partir d'acétate permet d'obtenir cette quantité en l'espace d'une demi-heure de culture. Nous avons pour ce calcul négligé les temps alloués à la préparation de chaque process (vidange, nettoyage, préparation des milieux, stérilisation) mais également le temps que dure le régime transitoire. La culture en fed-batch permet elle, en l'espace de 100h, d'obtenir près de 90 fois la quantité de lipides désirée. La culture en continu permet par conséquent un gain de temps de production significatif par rapport à la culture en fed-batch.

D'un point de vue économique, les cultures en fed-batch ont l'avantage d'avoir un meilleur rendement de conversion lipides/substrat. Les quantités d'acétate varient considérablement d'un mode de culture à l'autre. Près de 65 kg de substrat supplémentaire (soit environ 40%) sont nécessaires pour l'obtention de la même quantité de lipides lors d'une culture continue.

Enfin, le mode de production continu a l'avantage d'utiliser une solution d'alimentation moins concentrée en AGVs que la culture fed-batch. Ce point sera davantage explicité dans le chapitre V mais l'une des difficultés résidant dans l'emploi des AGVs issus de fermentation anaérobie pour la culture de levures oléagineuses est leur faible concentration finale dans le surnageant de culture. Une étape de concentration sera donc nécessaire entre les deux compartiments. Le fait que la concentration d'acétate utilisée dans le réservoir d'alimentation soit de 100 g/L (comparativement à la concentration d'acétate de 700 g/L utilisée en fed-batch) constitue un argument supplémentaire en faveur de la culture continue.

Il est intéressant de constater que les profils d'acides gras varient peu d'un mode de culture à l'autre (tableaux IV-6 et III-6).

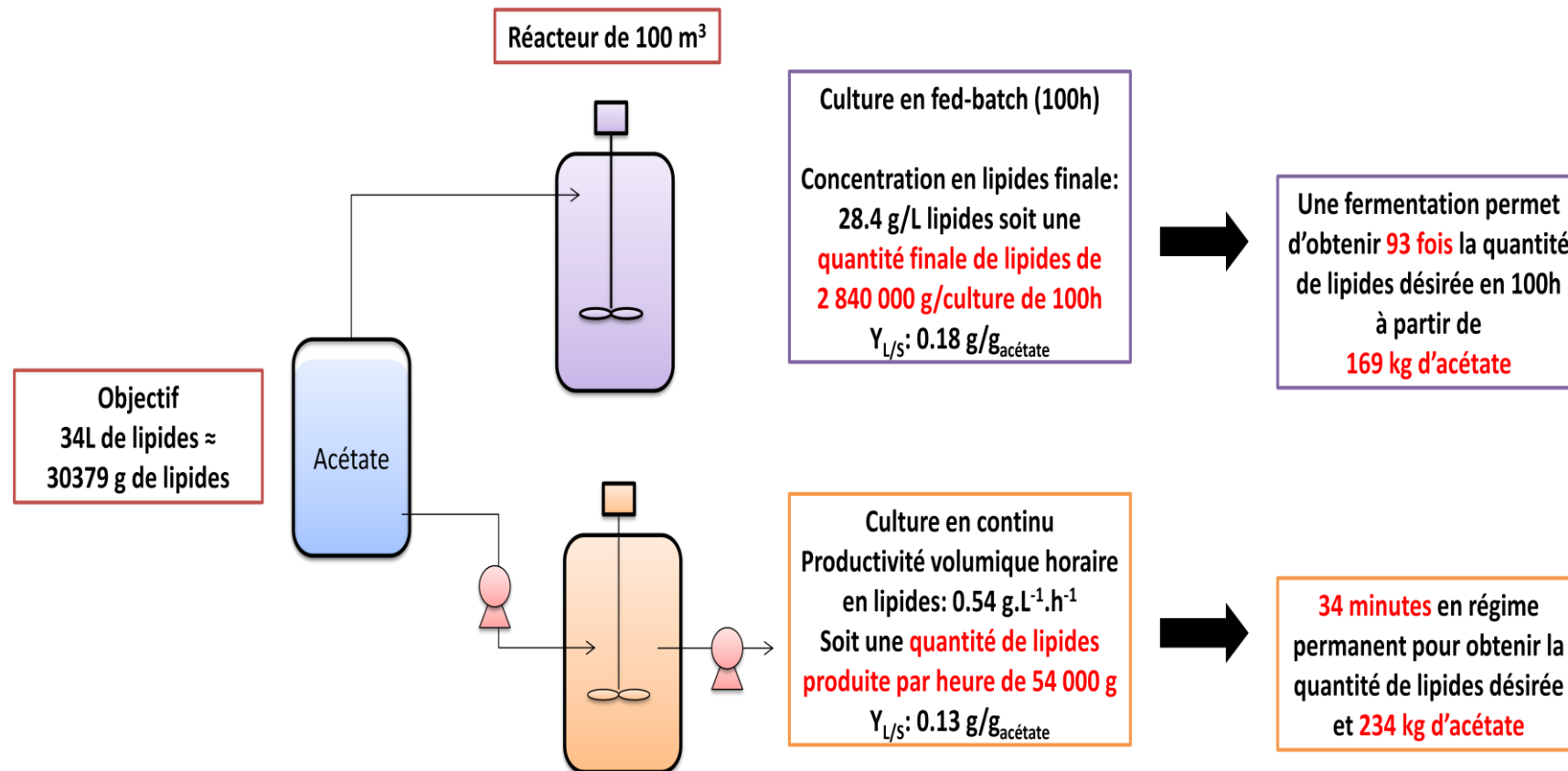


Figure IV-17. Obtention d'un litre de lipides levuriens à partir d'acétate selon les conditions de culture (fed-batch et continu) déterminées au cours de ce travail



En conclusion, les cultures en continu et en discontinu présentent chacune des avantages pour la production de lipides. Le mode fed-batch permet d'obtenir des concentrations en lipides élevées en peu de temps tandis que les cultures en continu permettent d'obtenir une productivité en lipide stable et conséquente. A l'échelle du laboratoire, les cultures continues sont des outils performants permettant de comprendre et d'interpréter les conséquences d'une modification de paramètres sur le comportement métabolique de la levure. Bien que certains aspects négatifs subsistent (risque de contamination, régime permanent long à atteindre), les avantages associés aux cultures continues (composition invariable du produit, contrôle du métabolisme, de l'environnement, productivités élevées) demeurent particulièrement attractifs.

#### **5.4. Conclusions**

Ce chapitre avait pour objectif l'étude de l'influence de certains paramètres opératoires (taux de dilution, limitations nutritionnelles) sur l'accumulation de lipides et la production de biomasse à partir d'acétate lors de cultures réalisées en mode continu. Un modèle de croissance et de production de lipides a permis d'identifier les paramètres opératoires les plus intéressants pour l'obtention de productivités volumiques horaires en biomasse et en lipides élevées. Ainsi, un taux de dilution de  $0,04 \text{ h}^{-1}$  et un rapport C/N de 50 ont été identifiés comme les plus favorables pour l'accumulation de lipides par *Cryptococcus curvatus* à partir d'acétate. Une culture expérimentale de la levure a permis d'obtenir des productivités volumiques horaires en biomasse et en lipides de, respectivement, 1,07 et  $0,54 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Ces valeurs sont bien plus élevées que celles reportées pour d'autres cultures continues de levures oléagineuses sur des substrats simples.

**CHAPITRE V : CULTURE DE LEVURES  
OLEAGINEUSES SUR DU SURNAGEANT DE  
CULTURE ANAEROBIE : FAISABILITE DU  
BIOPROCEDE A DEUX COMPARTIMENTS**

## 1. AVANT-PROPOS DU CHAPITRE V

Les chapitres III et IV présentent des résultats expérimentaux obtenus lors de cultures de levures oléagineuses réalisées à partir d'un substrat modèle et représentatif des AGVs, l'acétate. Leurs objectifs étaient l'identification des paramètres opératoires permettant de maximiser la production de biomasse et de lipides selon deux modes de culture : fed-batch et chimostat. A partir des informations obtenues au cours de ces travaux, les travaux rapportés dans le chapitre V ont pour objectif de produire de la biomasse et des lipides à partir cette fois de substrat dit « réel », c'est-à-dire de surnageant de culture anaérobie productrice d'hydrogène.

Ce surnageant de culture, riche en AGVs, peut être obtenu à la suite d'une fermentation anaérobie utilisant des résidus lignocellulosiques comme substrat initial (figure V-1). Les constituants majeurs de la biomasse lignocellulosique sont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Un prétraitement acide de cette biomasse permet de libérer les sucres en C6 et C5 fermentescibles composant la cellulose et l'hémicellulose. Ces sucres sont par la suite disponibles pour la production d'hydrogène par voie sombre qui s'accompagne d'une production d'AGVs, source carbonée utilisée pour la croissance et la production de lipides par la levure oléagineuse *Cryptococcus curvatus*.

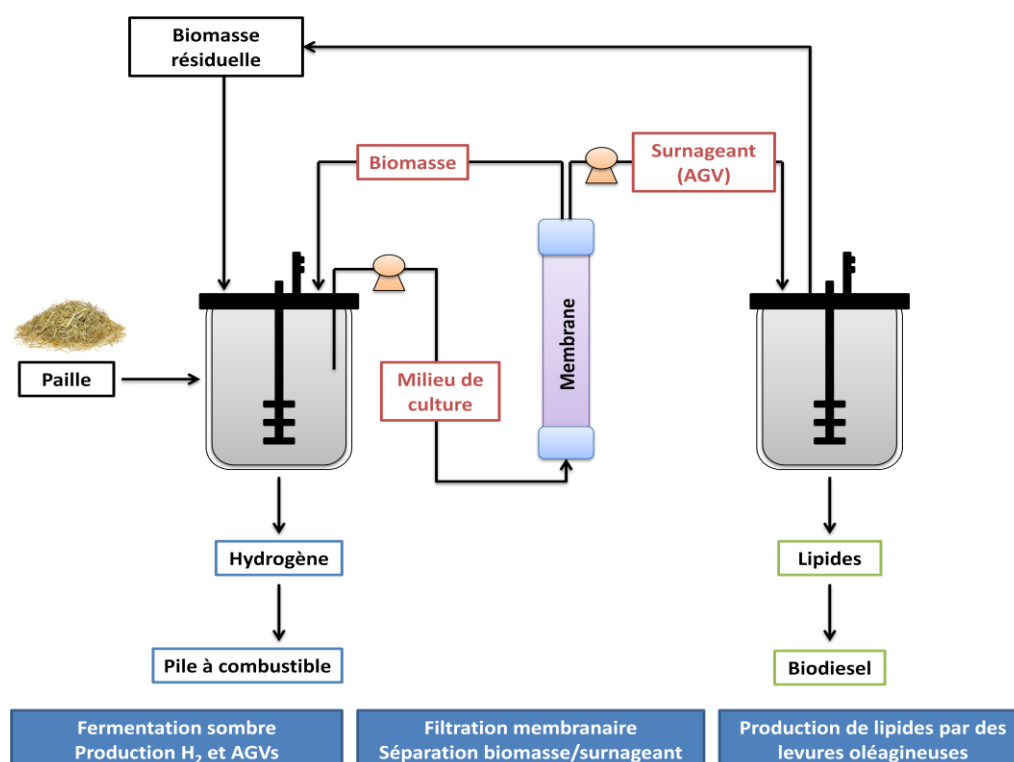


Figure V-1. Schéma du bioprocédé envisagé pour la production d'hydrogène et de lipides microbiens à partir de déchets lignocellulosiques.

L'ensemble des travaux présentés dans ce dernier chapitre s'attache à montrer la faisabilité du bioprocédé à deux compartiments présenté dans l'introduction de ce manuscrit. La première partie de ce chapitre vise à mettre au point un milieu de culture simplifié contenant les éléments minéraux essentiels à la croissance de la souche et permettant d'obtenir des cinétiques de croissance équivalentes à celles obtenues en milieu synthétique utilisé au cours des chapitres précédents. Dans un second temps, un article intitulé *Proof of concept for biorefinery approach aiming at two bioenergy production compartments, hydrogen and biodiesel, coupled by an external membrane* soumis à Biofuels (décembre 2015) sera présenté. Cet article s'intéresse à la mise en place du bioprocédé à deux compartiments et présente chaque étape de production et notamment la production de lipides à partir du mix d'AGVs. Enfin, dans une dernière partie, une discussion sera menée autour des résultats obtenus au cours de ce travail, des verrous existants et des solutions potentielles permettant de lever ces verrous.

## **2. CROISSANCE DE LA LEVURE OLEAGINEUSE *CRYPTOCOCCUS CURVATUS* SUR UN SURNAGEANT DE CULTURE ANAEROBIE**

### **2.1. Utilisation des AGVs comme sources de carbone pour la production de biomasse levurienne**

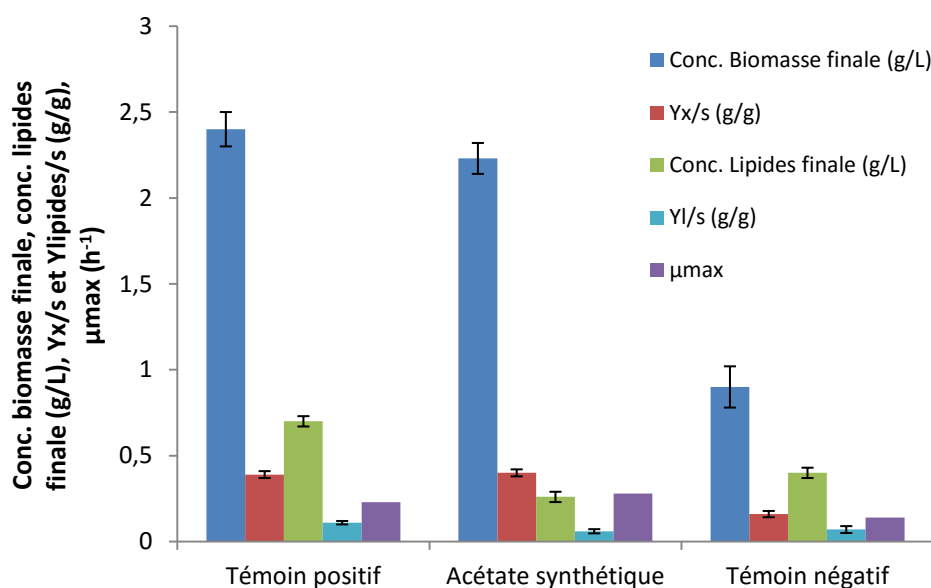
La première étape de ce travail a été de montrer la possibilité de cultiver *C. curvatus* sur un milieu de type surnageant de culture anaérobie. Pour ce faire, un surnageant issu d'une fermentation anaérobie réalisée à partir de glucose a été utilisé comme substrat. Les caractéristiques de ce surnageant sont présentées dans le tableau V-1. La concentration initiale en AGVs (24,5 g/L) dans le surnageant étant située au-dessus du seuil de toxicité, celui-ci a été dilué au quart afin de débiter la culture avec une concentration en AGVs proche de 6 g/L. Cette dilution a été effectuée d'une part avec de l'eau (surnageant dilué) et d'autre part avec un milieu synthétique (surnageant + éléments nutritifs) de façon à apporter l'ensemble des éléments minéraux nécessaires à la croissance à la levure (tableau V-1). Les résultats de ces cultures sont comparés à ceux obtenus avec un milieu synthétique contenant de l'acide acétique commercial (milieu synthétique) et présentés sur la figure V-2.

**Tableau V- 1. Composition des milieux utilisés au cours de ce travail.**

Composition (g/L)	Surnageant brut	Témoin négatif	Témoin positif	Surnageant + N	Surnageant + N, Mg	Surnageant + N, Mg, P
Acétate	2,500	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625
Butyrate	17,800	4,450	4,450	4,450	4,450	4,450
Propionate	4,300	1,075	1,075	1,075	1,075	1,075
Ions ammonium	0,141	0,035	0,035	0,035	0,035	0,035
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Nd	b	b + 3	b	b	b + 3
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	Nd	b	b + 3	b	b	b + 3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Nd	b	b + 3	b + 3	b + 3	b + 3
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	Nd	b	b + 1	b	b + 1	b + 1
Solution métallique et éléments traces <sup>a</sup>	Nd	b	b + a	b	b	b

<sup>a</sup> Solution métallique et d'éléments trace : (en g/L) ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 0,040 ; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 0,016 ; MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 0,0038; CoCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O 0,0005; CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O 0,0009; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O 0,00006; CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O 0,023 ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,003.

<sup>b</sup> les concentrations en éléments présents dans le surnageant sont dilués au quart lors des cultures de levures en bioréacteur.



**Figure V-2. Bilan de la première série de cultures en batch.**

Témoin positif : surnageant et milieu synthétique complet ; Acétate synthétique : culture réalisée à partir d'acétate synthétique et de milieu complet (voir figure III-5) ; Témoin négatif : surnageant dilué dans de l'eau. La concentration initiale en AGVs est de 5 à 6 g/L, le pH est de 7 et la température de 30°C.

La comparaison des résultats obtenus avec un milieu synthétique et avec le surnageant supplémenté en éléments minéraux confirment que la croissance de *C. curvatus* est possible sur le surnageant de culture obtenu à partir de la digestion anaérobie. Ces résultats indiquent qu'aucun inhibiteur de

croissance n'a été synthétisé lors de la digestion anaérobie. Le taux de croissance calculé avec du surnageant supplémenté est de  $0,23 \text{ h}^{-1}$ , ce qui est très proche des valeurs obtenues précédemment sur substrat et milieu synthétiques ( $0,28 \text{ h}^{-1}$ ) mais également supérieur à celui déterminé par Vajpeyi et Chandran (2015) pour la souche *Cryptococcus albidus* cultivée sur un surnageant de dégradation anaérobie riche en AGVs ( $0,03 \text{ h}^{-1}$ ). La concentration en biomasse finale obtenue au terme de la culture s'élève à  $2,4 \text{ g/L}$ , correspondant à un rendement de  $0,39 \text{ g/g}$ . Ce rendement est classiquement retrouvé dans la littérature sur des substrats simples tels que le glycérol (Meesters et al., 1996). Ce surnageant de culture anaérobie ne semble pas présenter d'inhibiteurs susceptibles de perturber la croissance de la souche. Les AGVs sont entièrement consommés en 50h de culture, ce qui montre que ce procédé est efficace pour leur élimination. Il est à noter que les trois AGVs présents dans le surnageant (acétate, propionate et butyrate) sont consommés par la souche. En fin de culture, une teneur en lipides de l'ordre de 30% est obtenue, correspondant à un rendement global de  $0,11 \text{ g/g}$ .

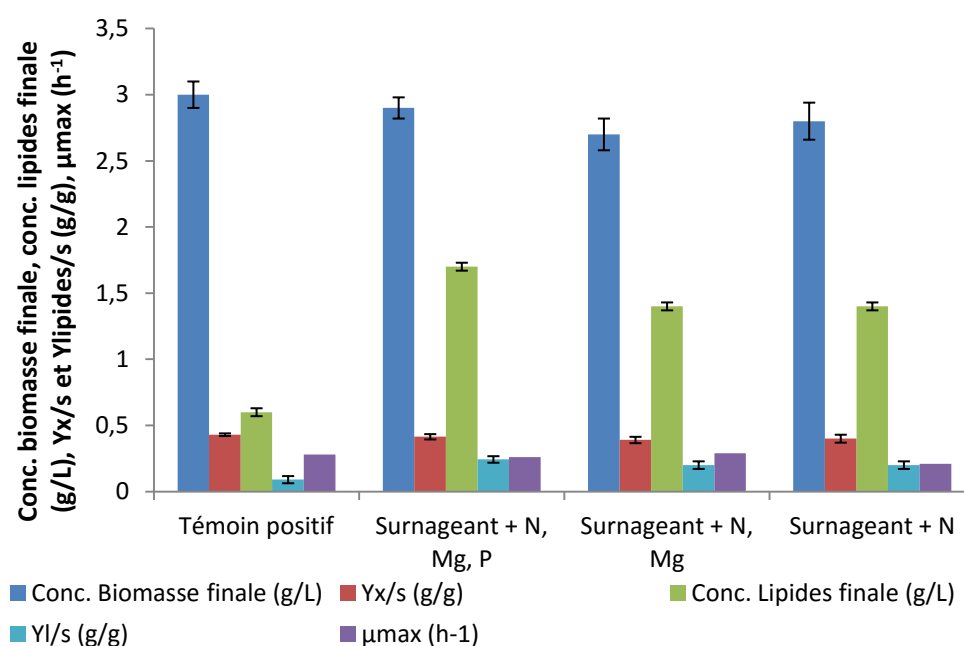
Les résultats obtenus avec du surnageant simplement dilué indiquent que des éléments minéraux sont présents en concentration insuffisante ou manquants dans le surnageant. En effet, la concentration en biomasse obtenue dans ces conditions est 2,7 fois inférieure à celle obtenue à partir du surnageant supplémenté et le rendement en biomasse est également beaucoup plus faible. Ce résultat s'explique partiellement par la très faible concentration en ions ammonium présente dans le surnageant initial comparativement à la concentration en substrats carbonés. Le rapport C/N du milieu est en effet de 76, ce qui est incompatible avec une croissance optimale de la souche. Ces premiers résultats confirment que le surnageant de culture anaérobie peut être utilisé en tant que milieu de culture des souches de levures oléagineuses s'il est supplémenté en éléments minéraux. Il a été montré qu'il était possible d'obtenir des cinétiques de croissance élevées et des rendements en biomasse proches de ceux obtenus à partir d'acétate synthétique ou de substrats simples.

Si l'apport d'ions ammonium semble être indispensable pour une croissance du microorganisme, d'autres macroéléments, microéléments ou éléments traces peuvent également être limitants malgré le fait que le milieu de culture utilisé pour réaliser la fermentation sombre soit un milieu relativement riche et complet. L'étape de dilution du surnageant permettant d'atteindre des concentrations non toxiques en AGVs proches de  $5 \text{ g/L}$  contribue mécaniquement à une dilution de ces ions qui deviennent alors limitants. Afin de réduire les coûts globaux du procédé, plutôt que de supplémenter de manière large, il est important de déterminer les éléments à apporter afin d'utiliser au maximum les éléments résiduels encore présents dans le surnageant.

La suite de l'étude a donc consisté à mettre au point un milieu de culture minimum à partir de surnageant en recherchant quels minéraux étaient essentiels à la croissance de la souche et en quelles concentrations.

## 2.2. Recherche des nutriments nécessaires à la croissance de la souche

Afin de déterminer la supplémentation nécessaire pour une croissance de *Cryptococcus curvatus* sur du surnageant dilué, plusieurs cultures en batch ont été réalisées en ajoutant différents macroéléments. Les sels de sulfate d'ammonium et de magnésium mais également les sels de phosphate de potassium et de sodium sont des éléments majoritaires du milieu de culture synthétique des levures (voir Chapitre II). L'influence des éléments azote, phosphore, potassium et magnésium ainsi que celle de microéléments contenus dans la solution métallique a donc été testée au cours d'une série de cultures. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus avec un surnageant dilué à l'aide de milieu synthétique complet (surnageant + éléments nutritifs) (figure V-3).



**Figure V-3. Bilan de la deuxième série de cultures en batch.**

Témoin positif : surnageant et milieu synthétique complet ; Surnageant + N, Mg, P : surnageant dilué dans de l'eau supplémentée en sulfate d'ammonium, sulfate de magnésium, phosphate de sodium monobasique et phosphate dipotassique ; Surnageant + N, Mg : surnageant dilué dans de l'eau supplémentée en sulfate d'ammonium et sulfate de magnésium ; Surnageant + N : surnageant dilué dans de l'eau supplémentée en sulfate d'ammonium. La concentration initiale en AGVs est de 6 g/L, le pH est de 7 et la température de 30°C.

Les résultats obtenus à l'issue de cette deuxième série de cultures en réacteur suggèrent que l'élément limitant principal dans le surnageant dilué est l'azote apporté ici sous forme de sel de sulfate d'ammonium. L'influence du soufre ne sera pas discutée ici. L'ajout de ce sel permet de retrouver les concentrations et les rendements en biomasse obtenus avec le témoin. L'ajout d'éléments phosphatés et de magnésium ne modifie pas les résultats. Ceci semble indiquer que les concentrations dans le surnageant en éléments phosphatés, en magnésium et également en éléments contenus dans la solution métallique (Tableau V-1) sont suffisantes pour assurer la croissance des levures.

En termes de cinétique de croissance, les taux de croissance maximaux calculés pour ces cultures varient entre 0,21 et 0,29 h<sup>-1</sup>. Ces valeurs sont proches de celles obtenues au cours des cultures réalisées sur acétate synthétique et milieu complet (voir Chapitre III). Une légère augmentation du taux de croissance est observée lorsque des ions magnésium sont apportés au milieu. Lusk et ses collaborateurs (1968) ont montré qu'une limitation par le magnésium pouvait avoir notamment une influence sur le taux de croissance maximal de *E. coli*, cet ion étant un élément assurant le bon fonctionnement des ribosomes (Lusk et al., 1968). Ce cation a également un rôle important dans la cellule comme co-facteur enzymatique.

Pour la suite de l'étude, nous avons donc choisi de travailler avec un surnageant dilué et supplémenté en ions ammonium et magnésium.

En ce qui concerne les productions de lipides dans ces cultures, la teneur en lipides lorsque les levures sont cultivées sur un milieu « complet » est de l'ordre de 20% (soit un rendement de 0,09 g/g). Des teneurs en lipides supérieures proches de 50% sont obtenues lorsque les surnageants ne sont pas supplémentés en éléments traces (pas de solution métallique). Ce résultat, qui devra être confirmé, semble indiquer qu'une carence en ces éléments favoriserait la production de lipides en fin de réaction. Des investigations complémentaires seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

En conclusion, ces premiers résultats de cultures de levures oléagineuses réalisées sur des surnageants de culture anaérobie ont permis de mettre en évidence :

- La possibilité de cultiver ces levures sur ces substrats complexes : les levures sont capables d'utiliser les AGVs produits au cours de la production d'hydrogène comme sources de carbone. Ce milieu de culture ne présente également pas d'inhibiteurs susceptibles de perturber la croissance des levures.



- La supplémentation du surnageant à l'aide de sulfates de magnésium et d'ammonium suffit pour obtenir des concentrations et des rendements en biomasse similaires à ceux obtenus lorsque les cultures sont réalisées sur un milieu synthétique « complet ».
- Cette supplémentation en éléments azote, magnésium et soufre permet également de retrouver des cinétiques de croissance élevées et similaires à celles obtenues précédemment au cours des cultures réalisées sur acétate synthétique.
- La production de lipides à partir de surnageant de culture anaérobie est également possible puisque 50% de teneur en lipides peuvent être obtenus en fin de culture, laissant entrevoir des possibilités de conversion importante des AGVs en lipides levuriens.

Ces résultats valident donc la possibilité de coupler les deux compartiments du procédé. Le système global a donc été mis en place en réalisant chacune des étapes en série en utilisant une extraction du surnageant via un module membranaire. Chacune des étapes a été réalisée afin de maximiser les concentrations dans chaque compartiment. Les résultats de ces premières expériences sont présentés dans un article intitulé *Proof of concept for biorefinery approach aiming at two bioenergy production compartments, hydrogen and biodiesel, coupled by an external membrane*, accepté par Biofuels en mars 2016.

### 3. PROOF OF CONCEPT FOR BIOREFINERY APPROACH AIMING AT TWO BIOENERGY PRODUCTION COMPARTMENTS, HYDROGEN AND BIODIESEL, COUPLED BY AN EXTERNAL MEMBRANE

Vanessa Béligon <sup>(1,2)\*</sup>, Alexandre Noblecourt <sup>(1,2,3)</sup>, Gwendoline Christophe <sup>(1,2,3)</sup>, André Lebert <sup>(1,2,3)</sup>, Christian Larroche <sup>(1,2,3)</sup>, Pierre Fontanille <sup>(1,2,3)</sup>

<sup>(1)</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, BP 20206, F-63174 AUBIERE cedex, FRANCE

<sup>(2)</sup> CNRS, UMR 6602, IP, F-63171 Aubière, France

<sup>(3)</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, LABEX IMobS3, BP 80026, F-63171 AUBIERE cedex, France

\*Corresponding author: Vanessa.Beligon@univ-bpclermont.fr

**Abstract :** The biorefinery concept is a facility that integrates biomass conversion processes and equipment to produce fuels, power, and chemicals from biomass. This concept is applied here to the hydrogen production by anaerobic fermentation. Its biological production is increasingly perceived as a potential pathway for developing renewable sources of energy, due to hydrogen's high energy content (142 kJ/g) and the absence of harmful emissions during utilization in a hydrogen fuel cell. The main secondary metabolites produced during dark fermentation (Volatile fatty acids) are building blocks and can also serve as alternate carbon source for lipid production from oleaginous yeast strains for biodiesel production.

The concept proposed here is the coupling of two main compartments. In the first one, lignocellulosic biomass is transformed by dark fermentation into hydrogen and VFAs. The medium used in the first compartment is transferred thanks to an immerse membrane bioreactor to the second compartment where the production of single cell oil with oleaginous yeast occurs using VFAs as carbon source. This study aims at presenting the feasibility of this bioprocess, through hydrogen production from glucose followed by lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* grown on the VFAs-enriched supernatant resulting from the dark fermentation step.

**Key-words:** submerged membrane bioreactor, hydrogen production, dark fermentation, volatile fatty acids, microbial lipids, oleaginous yeast.

### 3.1. Introduction

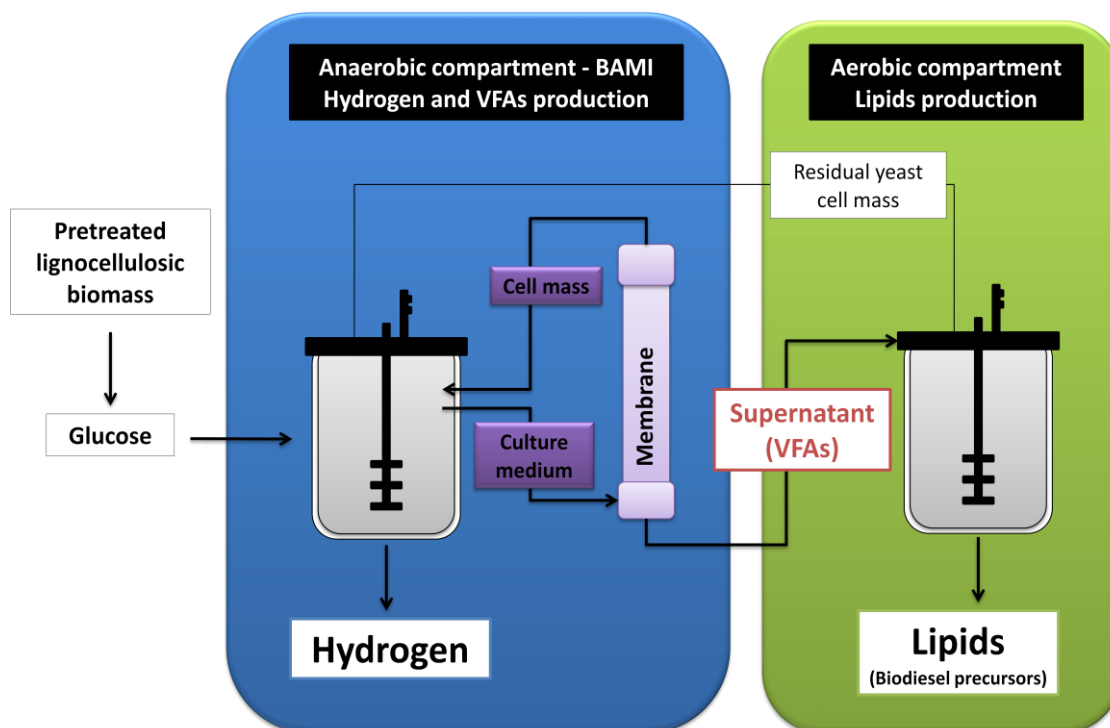
The gradual depletion of fossil fuels and the increasing concerns about the climate change both contribute to the amplification of the search of renewable energy sources. It is within this context that the biorefinery concept has emerged. Cherubini (2010) has defined the biorefinery as a facility which integrates biomass conversion processes and equipment to produce transportation biofuels, power, and chemical from biomass (Cherubini, 2010). Biorefinery aims at replacing fossil fuels based products with their equivalents resulting from the conversion of various biomass fractions into biogas, biofuels or biomolecules. The main feedstocks used for biorefinery are provided by agriculture (crops and residues, animal wastes), forestry (lignocellulosic biomass), industries and households (municipal wastes and wastewaters) and aquaculture (algae, seaweeds). Lignocellulosic biomass is particularly interesting because of two of its main components: cellulose and hemicellulose. They are both polymers of simple sugars (glucose for cellulose and a mix of C5 and C6 sugars for hemicellulose). Once hydrolyzed, these sugar monomers could be fermented to produce various molecules, for example ethanol for bioethanol production. In this study, the biorefinery concept is applied for hydrogen production from lignocellulosic biomass.

Hydrogen is a gas with a high energy potential (120 MJ/kg) when used as a fuel, quite as twice as important as natural gas (Dakrim-Lamari and Malbrunot, 2013). It is mainly used as raw material by chemical industries to produce ammonia, plastics, polyesters, nylons and methanol. It is also used in the petrochemical industry for the refining of fuels and to a lesser degree in metallurgy, electronics, pharmaceutical and food industries. In the coming years, the demand for hydrogen will be increasing sharply with the widespread use of fuel cells (Wang et al., 2011), but also for automobile, in communities, and different types of batteries or electricity storage. Production methods are mainly based on the use of fossil fuels (96%) by reforming natural gas and light hydrocarbons and pyrolysis of biomass. Innovative techniques are being developed and are based on the use of microorganisms. Among them, dark fermentation is gaining more and more interest in the scientific community. The aim of this process is the production of an energetic vector ( $H_2$ ) from wastes which also provides an important quantity of VFAs. The biorefinery approach aims at valorizing these VFAs extracted from the anaerobic compartment thanks to an immersed membrane bioreactor. VFAs are building blocks molecules which can be valorized through diverse applications (Singhania et al., 2013) such as in the microbial fuel cell domain (Yang et al., 2015) and for hydrogen and methane productions (Levin et al., 2007; Liu et al., 2006; Srikanth et al., 2009). In this study, VFAs are used as carbon source for cultivation of the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. Oleaginous microorganisms are able to accumulate lipids up to more than 20% of their dry mass, under particular culture conditions notably nitrogen (Meesters et al., 1996), phosphate or sulfate (Wu et al., 2011, 2010) limitations. Reserve

lipids are stored as triacylglycerols contained inside vesicles. These lipid droplets, also referred to as single cell oils, have a fatty acids profile close to those of vegetable oils currently used for first-generation biodiesel production. Therefore, microbial oils are considered as potential candidate as alternative of vegetable oils.

The yeast *C. curvatus* can efficiently convert various types of substrates (such as glucose, glycerol, synthetic acetate, VFAs etc) into large quantity of microbial lipids (Bélignon et al., 2015; Meesters et al., 1996; Xu et al., 2015; Yu et al., 2014). It was therefore chosen as the lipid producer for this two-step bioprocess. The valorization of VFAs from anaerobic compartment into lipids is particularly attractive in order to reduce the final fermentation cost.

The study aimed to demonstrate the feasibility of a biorefinery concept (Figure V-4). In a first bioreactor, glucose, which mimics sugar monomers obtained after acidic hydrolysis of lignocellulosic biomass, was chosen as carbon source to demonstrate the proof of concept. Since more complex substrates have to be used in the future, a bacterial consortium was used for hydrogen and VFAs production. These VFAs could be separated from the biomass thanks to a membrane technology between the two compartments. In the second bioreactor, VFAs are used as carbon source for growth and lipid production from the oleaginous yeast *C. curvatus*.



**Figure V- 4. Scheme of the biorefinery concept.**

In a first bioreactor, glucose, which represents sugar monomers obtained after acidic hydrolysis of lignocellulosic biomass, is degraded by a microbial anaerobic consortium to produce hydrogen and VFAs. These VFAs could be separated from the biomass thanks to a membrane technology in between the two compartments. The external membrane module is composed of 142 hollow fibers made of Polyvinylidene fluoride. The fibers, operated in the cross-flow “outside-in” mode, are immersed in the culture medium which is brought from the reactor by a peristaltic pump. The supernatant and the particles whose size is lower than the cut-off diameter cross the fibers and are recovered under the action of a withdrawal pump. The length of the column was 32.5 cm with a surface area  $A$  of 0.155 m<sup>2</sup> and a 0.2 µm cut-off diameter (Trad et al., 2015). The biomass returns to the first bioreactor while VFAs are brought to the second bioreactor. VFAs are used as carbon source for growth and lipid production from the oleaginous yeast *C. curvatus*.

## 3.2. Materials and methods

### 3.2.1. Microorganisms

The consortium for hydrogen production was selected from sewage sludge, recovered from a water treatment plant (Station 3 Rivières, Clermont-Ferrand, France).

The sludge was cultured in complete medium in the presence of 2-bromoethanesulfonate to remove Archaea responsible for methane production (Bullock and Kristiansen, 1989).

The oleaginous yeast employed for lipid production was *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. It was maintained on Potato Dextrose Agar plate at 25°C and sub-cultured every week.

### **3.2.2. Hydrogen production by dark fermentation**

#### **3.2.2.1. Medium culture**

The medium culture was adapted from Gaudet et al. (1992) (Gaudet et al., 1992). The composition was (in g.L<sup>-1</sup>): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.4; FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 3.75; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.35; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.35; NaCl 0.9; ZnCl<sub>2</sub> 0.41 ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O 0.3; NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.13 ; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.13 ; CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.075 ; Hemin 10<sup>-3</sup> ; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.4·10<sup>-4</sup> ; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.4·10<sup>-4</sup> ; biotine 2·10<sup>-4</sup> ; PABA 10<sup>-4</sup> ; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 8·10<sup>-5</sup> ; MnSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 3·10<sup>-5</sup> ; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 3·10<sup>-6</sup>. Glucose concentration was set at 8 g.L<sup>-1</sup> in preculture medium and 60 g.L<sup>-1</sup> for medium culture. After sterilization, the medium was reduced with CO<sub>2</sub> flow and the addition of L-cysteine (0.5 g.L<sup>-1</sup>) to discharge oxygen. Carbonates (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4g.L<sup>-1</sup>) were added to adjust the pH at 6.

#### **3.2.2.2. Hydrogen production from glucose**

Inoculum was prepared as follows: five flasks containing 90 mL of medium culture previously described were inoculated with 10 mL of the consortium. These precultures were incubated for 13 hours at 37°C in a rotary shaker with an agitation rate of 100 rpm. The precultures were transferred in the reactor once biomass concentration reached 2 g.L<sup>-1</sup>.

Batch experiments were conducted in submerged membrane bioreactor. This system was composed of a bioreactor (GPC-Bio, La Rochelle, France) with a working volume of 5L and a hollow fiber membrane module. The bioreactor was inoculated at 10% (v/v) with 500 mL of inoculum. Temperature was set at 35°C and agitation at 100 rpm. pH was maintained at 6 by a classical pH regulation system (GPC-Bio, La Rochelle, France), using automatic additions of KOH 5N and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N.

#### **3.2.2.3. Analytical methods for gas phase**

The biogas production volume was measured using a drum counter (Ritter – type TG0.5/5). Data were analyzed with Rigamo 3.1® software. Qualitative and quantitative analysis of biogas composition were carried out by a micro Gas Chromatography (Agilent Technologies 3000A) and analyzed with Soprane® software.

### **3.2.3. Membrane module**

The bioreactor was connected to an external membrane module composed of 142 hollow fibers made of Polyvinylidene fluoride operated in the cross-flow “outside-in” mode, meaning that the system design corresponded to the so-called external immersed membrane bioreactor. The membrane bioreactor used in this study was previously developed and described by Trad and co-workers (Trad et al., 2015).

The length of the column was 32.5 cm with a surface area  $A$  of  $0.155 \text{ m}^2$  and a  $0.2 \text{ }\mu\text{m}$  cut-off diameter (Trad et al., 2015). The outer loop volume was close to 0.5 L. To extract the supernatant at the end of the batch, the medium circulated in the membrane module thanks to a peristaltic pump (Watson Marlow Qdos 30 Universal+), with a flow rate of  $395.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . The hollow fibers were connected to a withdrawal pump (Gilson Minipuls 2) to remove culture medium with an initial flow rate of  $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . To avoid the fouling of the fibers,  $\text{CO}_2$  flushes were carried out.

### **3.2.4. Lipid production by the oleaginous yeast *C. curvatus* using VFAs as carbon source**

#### **3.2.4.1. Medium culture**

A part of the supernatant obtained after filtration was used for pre-culture and culture of *C. curvatus*. The residual supernatant volume was used to realize a fed-batch. The supernatant was diluted with water to obtain a final VFAs concentration of  $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  for the first preculture and  $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  for the second preculture and for the bioreactor culture. This medium was supplemented with mineral salts whose concentrations were (in  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$  3;  $\text{MgCl}_2$ ,  $7\text{H}_2\text{O}$  1. The medium was steam autoclaved at  $121^\circ\text{C}$  and 103.4 kPa (15 psi) for 20 minutes.

#### **3.2.4.2. Inoculum preparation**

A first 100 mL preculture of *C. curvatus* was prepared in the diluted supernatant containing  $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  of VFAs. It was inoculated with colonies picked out from an agar plate. Erlenmeyer flasks were incubated for 30 hours at  $30^\circ\text{C}$ . A second preculture inoculated at 10% (v/v) from the first preculture was realized in 400 mL working volume. VFAs concentration was  $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . This preculture was incubated for 40 hours at  $30^\circ\text{C}$  in a rotary shaker with an agitation rate of 100 rpm.

#### **3.2.4.3. Submerged fermentation**

Yeast culture was performed in an aerated and stirred 7L tank bioreactor (GPC-BIO, La Rochelle, France) with a working volume of 5L. The temperature was maintained at  $30^\circ\text{C}$  and the pH was controlled at 7.0 by automatic addition of a 4N sulfuric acid solution. Initial agitation and aeration conditions were set at 400 rpm and  $0.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  respectively and increased to a maximal value of 1000 rpm and  $2.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Oxygen consumption and carbon dioxide production rates were measured by a gas analyser (ZRE gas analyser, Fuji Electric, Japan). Online data process parameters was done using an acquisition software (C-BIO, La Rochelle, France). Initial VFAs concentration was  $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Once VFAs concentration reached  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , a fed-batch with the residual supernatant (0.8 L) was added to induce lipid production by addition of an excess of carbon in the medium (C/N ratio increased to 15).

### **3.2.5. Analytical methods**

#### **3.2.5.1. Determination of dry cell weight and turbidity**

Turbidity was determined at 600 nm using a spectrophotometer (Safas Monaco, UV mc<sup>2</sup>).

For dry cell weight determination, 5 mL of culture broth were used. Wet cells were recovered by centrifugation at 10,000g for 10 minutes. Cell dry weight was obtained by drying in an oven at 110°C to constant weight in pre-weighed tubes.

#### **3.2.5.2. Determination of glucose and volatile fatty acids concentrations**

The concentration of glucose and VFAs was determined in filtered aliquots of the culture by a HPLC apparatus (Agilent 100, Agilent Technology) fitted with two columns (Rezex ROA 300x7.8 nm, Phenomenex, USA) mounted in serial assembly in an oven (50°C) with a refractometer as detector. The mobile phase consisted of 2 mM sulfuric acid in ultra-pure water pumped at 0.7 mL.min<sup>-1</sup> and 70 bars (7000 kPa). For the analysis, 2 mL of sample were mixed with 250 µL of Ba(OH)<sub>2</sub>, 8H<sub>2</sub>O (0.3 M) and 250 µL of ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (5% w/v) (Agilent 100, Agilent Technology). The mixture was centrifuged at 10 000 g for 5 minutes. The supernatant was filtered through a 0.2 µm cellulose acetate filter and injected in the HPLC apparatus.

#### **3.2.5.3. Measurement of ammonium concentration**

Ammonium concentration was determined by the colorimetric method of Patton and Crouch, 1977 (Patton and Crouch, 1977). One hundred microliters of sample were mixed with 500 µL alkaline hypochlorite, 500 µL of phenol nitroprusside and 3 mL of distilled water. The mixture was incubated at 25°C for one hour and the absorbance was recorded at 570 nm. A calibration curve was done using (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solutions (0-80 mg N.L<sup>-1</sup>).

#### **3.2.5.4. Cellular lipids extraction and analysis of fatty acid composition**

Culture samples were disrupted at 2,500 bars using a bench-top cell disruptor (Constant System Limited, Low March, Daventry NN11 4SD, United Kingdom). 0.5 mL of the milling were mixed with 4 mL of chloroform, 2 mL of methanol and 1 mL of water, as presented in previous works (Bélignon et al., 2015). After a 10 min-centrifugation step at 2,000 g, the organic phase was recovered in pre-weighed tubes. Lipids were obtained after evaporation of the solvent in a speed-vacuum at 40°C until constant weight. Lipids were then conserved in chloroform at -20°C. All the extractions were realized in triplicate.



The fatty acids profile of the lipid was determined by saponification followed by methylation for conversion of fatty acids to fatty acid methyl esters (FAMES) according to the method of Morrison and Smith (Morrison and Smith, 1964). Eight hundred microliters of MeOH/BF<sub>3</sub> (14%) were added to 100  $\mu$ L of sample and put in a water bath during 15 minutes at 100°C. After the addition of 1.5 mL of water and 750  $\mu$ L of hexane containing an internal standard (heptadecane, 1% (v/v)), 1  $\mu$ L was injected in a gas chromatograph (HP6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) fitted with an apolar supelco SPB-5 (Supelco Inc., Bellefonte, PA) capillary column (30 x 0.32 mm i.d., film thickness 0.25  $\mu$ m) and a flame ionization detector. The oven was programmed to raise its temperature from 170°C to 220°C at a 3°C.min<sup>-1</sup> rate and at the end kept for 3 minutes at 220°C. Nitrogen was the carrier gas at 0.80 mL.min<sup>-1</sup>. The split ratio was 1:50 (v/v). The injector and detector temperatures were set at 250 and 280°C, respectively. The identification of methyl esters was done by comparing the retention times with known standards.

#### *3.2.5.5. Prediction of biodiesel parameters*

The parameters which define the quality of the final product (biodiesel) were estimated from the FAMES composition of the lipids extracted at the end of the lipid production process. They were predicted by the models presented in Table V-2 and were : cetane number (CN), density ( $\rho$ ), heat of combustion ( $\Delta H_c$ ), oxidative stability index (OSI), kinematic viscosity ( $\nu$ ) and iodine index (II). The predictions were based on the characteristics of each methyl ester, as detailed in Table V-3. The parameters of the final biodiesel were then compared to the values imposed by current standards EN 14214 (Europe) and ATSM D6751 (USA).

**Tableau V- 2. Prediction models of biodiesel parameters, based on their FAMES composition.**

Parameter	Equation	Reference
Cetane number	$CN = \sum \frac{CN_{me} \%ME}{100}$	(Ramos et al., 2009)
Density (kg.m <sup>-3</sup> )	$\rho = \sum \frac{\rho_{me} \%ME}{100}$	(Pereyra-Irujo et al., 2009)
Heat of combustion (kJ.g <sup>-1</sup> )	$\Delta H_c = \sum \frac{\Delta H_{c_{me}} \%ME}{100}$	(Pereyra-Irujo et al., 2009)
Kinematic viscosity (mm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	$\ln(v) = \sum \frac{\ln(v_{me}) \%ME}{100}$	(Pereyra-Irujo et al., 2009)
Iodine index (g <sub>I2</sub> /100 g)	$II = \sum \frac{253.82 * DB * \%ME}{MM_{me}}$	(Ramos et al., 2009)
Oxidative stability index (h)	$OSI = \sum \frac{OSI_{me} \%ME}{100}$	(Ramos et al., 2009)

ME : methyl esters. MM : molar mass. DB : number of double bonds. The atomic weight of two iodine atoms which bond to a double bond is 253.82 g.mol<sup>-1</sup>. The fractions of each methyl esters present are represented by %ME.

**Tableau V- 3. Parameters from literature for methyl esters of different fatty acids.**

FAME	Formula	Molar mass (g.mol <sup>-1</sup> )	Cetane number	Density (kg.m <sup>-3</sup> )	Kinematic viscosity (mm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	Heat of combustion (kJ.g <sup>-1</sup> )	Oxidative stability index (h)
Methyl palmitate	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270.46	74.5 <sup>a</sup>	852 <sup>b</sup>	4.32 <sup>b</sup>	39.47 <sup>a</sup>	>40 <sup>c</sup>
Methyl palmitoleate	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	268.44	51 <sup>a</sup>	875 <sup>b</sup>	3.67 <sup>a</sup>	39.32 <sup>a</sup>	2.1 <sup>c</sup>
Methyl stearate	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	298.51	86.9 <sup>a</sup>	850 <sup>b</sup>	4.74 <sup>b</sup>	40.1 <sup>a</sup>	>40 <sup>c</sup>
Methyl oleate	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	296.49	59 <sup>a</sup>	874 <sup>b</sup>	4.51 <sup>b</sup>	39.93 <sup>a</sup>	2.5 <sup>c</sup>
Methyl linoleate	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	294.48	42.2 <sup>a</sup>	889 <sup>b</sup>	3.27 <sup>b</sup>	39.72 <sup>a</sup>	1 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> (Knothe, 2005)

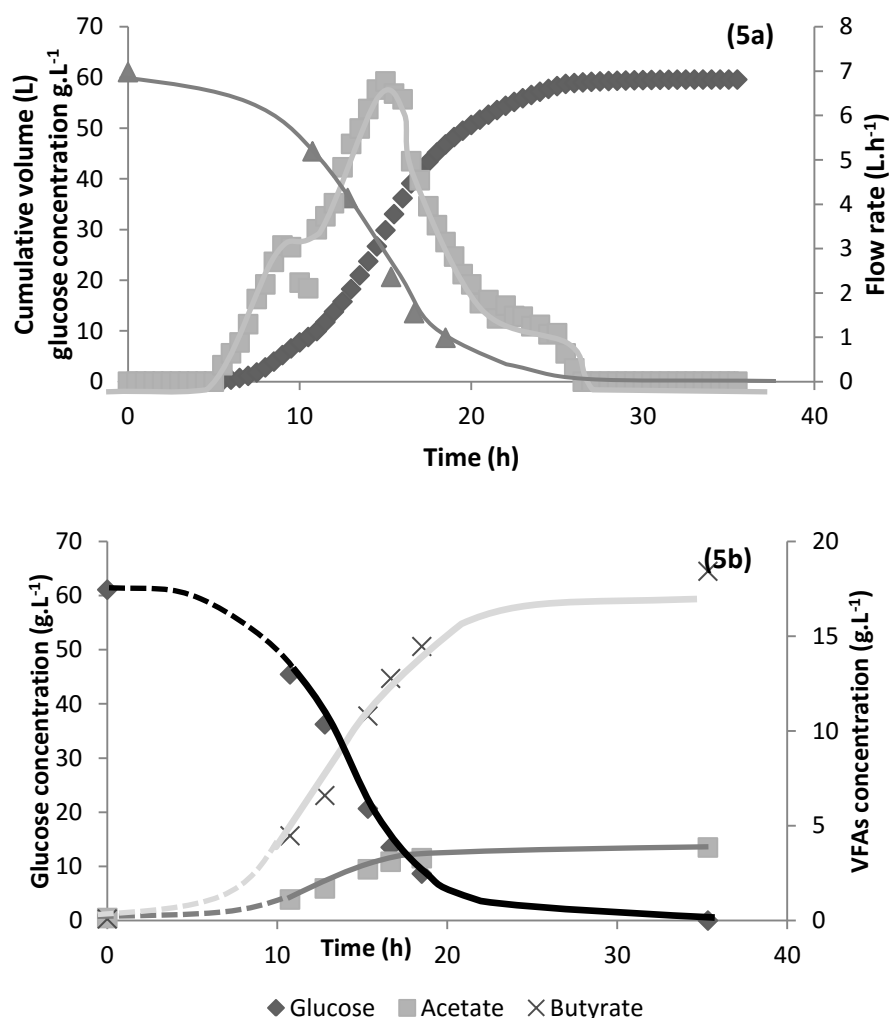
<sup>b</sup> (Lapuerta et al., 2010)

<sup>c</sup> (Moser, 2009)

### 3.3. Results and discussion

#### 3.3.1. Dark fermentation process

##### 3.3.1.1. Biohydrogen production



**Figure V- 5.** Biohydrogen production.

**(5a)** Monitoring production of biohydrogen (cumulative production and flow rate) and glucose consumption **(5b)** Glucose consumption and volatile fatty acids production in dark fermentation

The time course of hydrogen production from glucose is presented in figure V-5a. After a five hours lag phase, hydrogen production increased exponentially until the fifteenth hour of culture. At this time, a maximal flow rate of  $6.8 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{h}^{-1}$  was reached. The hydrogen proportion was 50% in the biogas, no methane nor  $\text{H}_2\text{S}$  were detected. Then, after a short stationary phase of one hour, hydrogen production slowed down drastically even if no compound in the medium seemed limiting. This phenomenon was explained by the high VFAs concentration ( $14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in the medium which had an inhibitory effect against hydrogen production (see 3.3.1.2). The culture and the hydrogen production

stopped after 27 hours of culture when all the carbon source was consumed. At the end of the batch culture, 59.6 L of hydrogen were produced, corresponding to a global yield of  $1.46 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ . The maximal hydrogen yield obtained was  $2.26 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$  after 15h of culture. These data were close to the maximum stoichiometric yield admitted with bacterial consortia ( $2.5 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ ) (Latrille et al., 2011). A comparison with literature data indicated that the yield obtained with this culture was one of the most interesting in these conditions. The results were even similar to those obtained with thermophilic conditions or using axenic cultures during which hydrogen production yields are generally higher than with mixed culture (table V-4). The overall hydrogen production rate achieved  $440 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  with a maximum of  $1195 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . The improvement of the culture conditions for hydrogen production carried out beforehand for this experiment allowed obtaining significant results. This value was five times higher than the productivity reported for example by Su et al. with *Cl. butyricum* (Su et al., 2009).

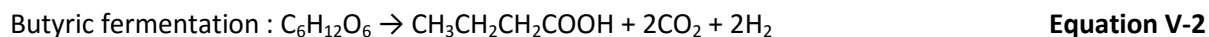
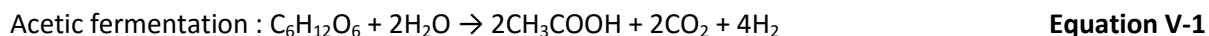
**Tableau V- 4. Report gas phase analysis**

Inoculum	Substrate	Culture type	T (°C)	$Y_{\text{H}_2}$ ( $\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{hexose}}$ )	HPR ( $\text{mL}_{\text{H}_2}/\text{L}/\text{heure}$ )	Ref.
Manure + <i>Cl. Cellulolyticum</i>	glucose	batch	35	1.46	440	This study
<i>Cl. butyricum</i>	glucose	batch	30	1.36	-	(Hilgsmann et al., 2011)
Sludge	glucose	batch	30	1.04	-	
mesophilic consortium + glucose	glucose	fed-batch	60	2.1	-	(Karadag, 2011)
mesophilic consortium + sludge	glucose	fed-batch	60	2.3	-	
<i>Cl. butyricum</i>	glucose	batch	35	1.59	86.8	(Su et al., 2009)
Sediment-rich water (geothermal source) PGR	glucose	batch	60	1.65	-	(Hniman et al., 2011)
	xylose	batch	60	2.05	-	
	glucose + xylose	batch	60	1.78	-	
<i>Cl. butyricum</i> CGS5	xylose	batch	37	0.73	212.5	(Lo et al., 2008)
<i>Cl. pasteurianum</i> CH4	saccharose	batch	37	2.07	569	

### 3.3.1.2. Volatile Fatty Acids production

The time course of VFAs production is presented in figure V-5b. In the used conditions, the main VFAs co-produced with hydrogen were acetate and butyrate. This result indicated that, at least

during the 15 first hours, the metabolic pathways used by microorganisms were mainly the butyric fermentation pathway (Eq V-1) and the acetic fermentation pathway (Eq V-2).



After 15 hours of culture, when  $\text{H}_2$  production decreased drastically, other metabolites appeared in the medium (ethanol, lactate and propionate) (Figure V-5b). These phenomena could be due to the toxicity of VFA produced in large amount in the medium at this time of the batch culture. The toxicity of VFAs was evidenced by several authors (Srikanth and Venkata Mohan, 2014; Zhang et al., 2012) but the inhibitory concentration was not clearly determined and seemed dependent of the consortium. The toxicity threshold could also vary according to the ratio Butyrate/Acetate (Zhang et al., 2012). In this study from a cumulative VFA concentration of  $10\text{g.L}^{-1}$ , the  $\text{H}_2$  production flow rate slowed down. When the VFAs concentration reached  $14\text{-}15\text{g.L}^{-1}$ , the  $\text{H}_2$  production rate decreased and finally stopped after few hours. The final VFAs composition in supernatant is reported in table 3. Acetate and butyrate raised respectively  $4.59\text{ g.L}^{-1}$  and  $18.55\text{ g.L}^{-1}$  (ratio B/A = 4). The total VFAs concentration reached close to  $25\text{g/L}$  after 35 hours of culture. These relatively high VFAs concentration made it possible to consider its use as substrate for oleaginous strain.

### **3.3.2. Membrane filtration**

At the end of the batch culture, the resulting medium was filtered thanks to the membrane module previously described. A global VFAs extraction yield of 97.2% was obtained (Table V-5). All VFAs could then be recovered thanks to this system. Finally, a volume of 4.5 liters of supernatant was recovered, containing a global VFAs and ammonium concentrations of, respectively,  $22.8$  and  $0.246\text{ g.L}^{-1}$  (table 4) and a C/N ratio of 45. No microorganisms were detected in the permeate. Using membrane technology seemed particularly interesting since it led to obtain sterile supernatant which could be directly used in the second compartment of the two-stage bioprocess. The supernatant obtained after filtration was diluted to raise a VFAs concentration of  $12\text{ g.L}^{-1}$  to limit their toxicity with a mineral salts solution (part 3.2.4.1) and transferred to the second bioreactor for yeast and lipids production. In order to verify the proof of concept, the membrane filtration was first realized at the end of the anaerobic culture. However, in future experiments, this technology will be used continuously during the culture to join the two compartments of the global bioprocess. Studies reported in the literature implying submerged membrane anaerobic bioreactors have given interesting results for hydrogen production (Bakonyi et al., 2014; Shen et al., 2009).

**Tableau V- 5. Metabolites produced during dark fermentation and membrane filtration results of supernatant.**

	Acetate concentration (g.L <sup>-1</sup> )	Butyrate concentration (g.L <sup>-1</sup> )	Propionate concentration (g.L <sup>-1</sup> )	Total VFAs (g.L <sup>-1</sup> )	Lactate concentration (g.L <sup>-1</sup> )	Ethanol concentration (g.L <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> concentration (g.L <sup>-1</sup> )	C/N ratio	Glucose consumed (g)	Carbon results (%)
Retentate <sup>1</sup>	4.59	18.55	0.09	23.23	1.96	1.05	0.260	42	305.37	86
Permeate <sup>2</sup>	4.51	18.21	0.09	22.81	1.67	ND	0.246	45	-	-
Y <sub>filtration</sub>	98.1%	98.2%	100.0%	97.2%	85.2%	-	94.6	-	-	-

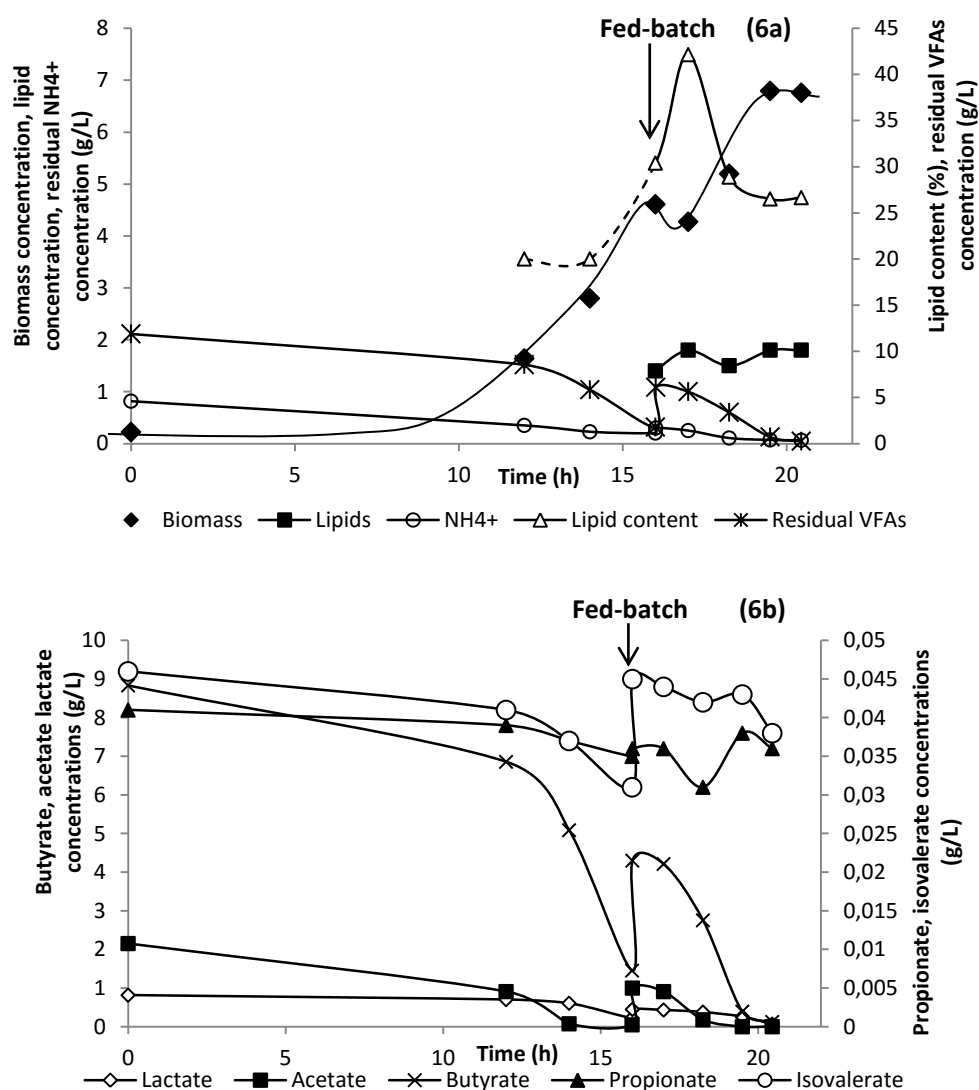
<sup>1</sup> remaining culture medium (unfiltered)

<sup>2</sup> supernatant obtained after filtration

### 3.3.3. Use of supernatant by *Cryptococcus curvatus*

The process was divided into two parts. A first batch aimed at producing biomass, then, lipids accumulation was induced by increasing C/N ratio by addition of supernatant containing VFAs without supplementation.

#### 3.3.3.1. Cell mass production



**Figure V- 6. Lipid production from *C. curvatus* grown on VFAs as carbon source.**

Culture started with initial VFAs concentration of  $12 \text{ g.L}^{-1}$ . When  $2 \text{ g.L}^{-1}$  of VFAs were left in the reactor at the 16<sup>th</sup> hour of culture, a fed-batch with pure VFAs was added to the medium, increasing the total VFAs concentration to  $6 \text{ g.L}^{-1}$ . pH was set to 7.0 and temperature was set to  $30^\circ\text{C}$ . **(6a)** Time course of biomass and lipids concentrations, lipid content; residual VFAs and ammonium ions concentrations; **(6b)** Time course of residual acetate, butyrate and lactate concentrations.

Even if preculture was previously cultivated on VFAs as carbon source, a lag phase of about 6 hours was observed (Figure V-6a). Initial VFAs concentration ( $12 \text{ g.L}^{-1}$ ) could be still too high to avoid toxic effect on biomass. Then, an exponential phase was observed with a specific growth rate  $\mu$  of  $0.24 \text{ h}^{-1}$ , which was close to the maximal specific growth rate value obtained from *C. curvatus* culture grown on synthetic acetate ( $0.28 \text{ h}^{-1}$ ) (Béligon et al., 2015) and much higher than the value reported by Vajpeyi and Chandran (Vajpeyi and Chandran, 2015) for *C. albidus* grown on VFAs ( $0.021 \text{ h}^{-1}$ ).

The specific substrate consumptions were determined at the end of this first batch (16 hours) (Figure V-6b). Among all VFAs, acetate and butyrate were the two preferentially consumed by the yeast, with specific rate of consumption of respectively,  $28 \text{ mg.g}_{\text{cell mass}}^{-1}.\text{h}^{-1}$  and  $100 \text{ mg.g}_{\text{cell mass}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Lactate was consumed once butyrate and acetate concentrations were depleted. Propionate was poorly consumed ( $0.08\text{e}^{-3} \text{ mg.g}_{\text{cell mass}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Previous works from Vajpeyi and Chandran (Vajpeyi and Chandran, 2015) revealed that, contrary to our results, acetate consumption rate was higher than butyrate consumption rate ( $47.9$  vs  $7.4 \text{ mg.g}_{\text{cell mass}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), making acetate the preferential substrate for *C. albidus*. More investigations might be necessary to explain the comportment of the tested strain of the different VFAs contained in the supernatant.

These very encouraging results indicated that the strain selected in this study was able to consume substantially all of the VFAs content in the supernatant for the production of biomass. The culture conditions allowed obtaining specific growth rate much higher than those found in the literature.

### 3.3.3.2. Lipids production

After 16 hours of culture, an addition of 800 mL of supernatant was carried out in order to increase VFAs concentration (Figure V-6a and V-6b). No nitrogen supplementation was performed. This carbon supply aimed at inducing lipid production by increasing the C/N ratio in the medium from 5 to 15. As a consequence, lipid content increased to 42% of cell mass dry weight, corresponding to a lipid concentration of  $1.8 \text{ g.L}^{-1}$ . The addition in excess of carbon seemed to induce lipids production.

However, after only two hours, even if the C/N ratio remained greater than 10, the VFAs concentration decreased significantly and the lipid content of the yeast started to decrease from 42 to 27% (Figure V-6a). This phenomenon has already been reviewed in literature as the lipid turn over (Chen et al., 2012; Peng et al., 2013). The lipid turn over consisted of the degradation of internal storage lipids when carbon sources were exhausted in the medium. To avoid it, the culture should be stopped before carbon exhaustion or supplementary carbon source should be added in the medium to maintain or increase this lipid content.



**Tableau V- 6. Cell mass and lipid production by oleaginous yeasts on various renewable substrates.**

Strain	Substrate*	Fermentation time (h)	Cell mass conc. (g/L)	Maximal lipid content (%)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{l/s}$ (g/g)	Growth rate ( $h^{-1}$ )	Reference
<i>C. curvatus</i>	VFAs <sup>(12+4)</sup>	21	6.8	42	0.39	0.13	0.24	This study
<i>C. curvatus</i>	Beet pulp hydrolysates <sup>(52)</sup>	96	15.8	43.6		0.14		(Wang et al., 2015)
<i>T. fermentans</i>		96	16.9	34.4		0.11		
<i>T. cutaneum</i>		96	17.1	42.1		0.14		
<i>R. diobovatum</i>	Biodiesel-derived glycerol <sup>(50)</sup>	192	13.6	50.7				(Munch et al., 2015)
<i>R. toruloides</i>	Crude glycerol <sup>(150)</sup>	120	16.6	40.4	0.33	0.22		(Yang et al., 2015)
<i>C. curvatus</i>	Mannitol/VFAs <sup>(9.3)</sup>	84	3.6	48.3				(Xu et al., 2014)
<i>C. curvatus</i>	VFAs <sup>(9.3)</sup>	120	2.5	61	0.27	0.15		(Xu et al., 2015)
<i>C. albidus</i>	VFAs <sup>(10)</sup>		0.96	14.9		0.03	0.021	(Vajpeyi and Chandran, 2015)
<i>R. toruloides</i>	Distillery wastewaters	72	8.1	43.7				(Ling et al., 2013)
<i>C. curvatus</i>	Residual yeast cell mass <sup>(20%)</sup>	168	6.6	21.1				(Espinosa-Gonzalez et al., 2014)
<i>R. toruloides</i>	Cassava starch <sup>(6%)</sup>	120	20.1	64.9				(Gen et al., 2014)
<i>R. toruloides</i>	Crude glycerol <sup>(50)</sup>	120	23.1	40.9		0.12		(Uçkun Kiran et al., 2013)
<i>R. kratochvilovae</i>	Aqueous extract of fruit pulp <sup>(100%)</sup>	144	8.9	53.2				(Patel et al., 2015)

\* The substrate concentrations (in g/L or in % w/v) are indicated in superscripts.

At this stage of the experiment, the VFAs concentration became limiting, yeast reconsumed lipids for cell mass synthesis and maintenance. At the end of the culture, final cell mass concentration reached  $6.7 \text{ g.L}^{-1}$  with a lipid content of 27%.

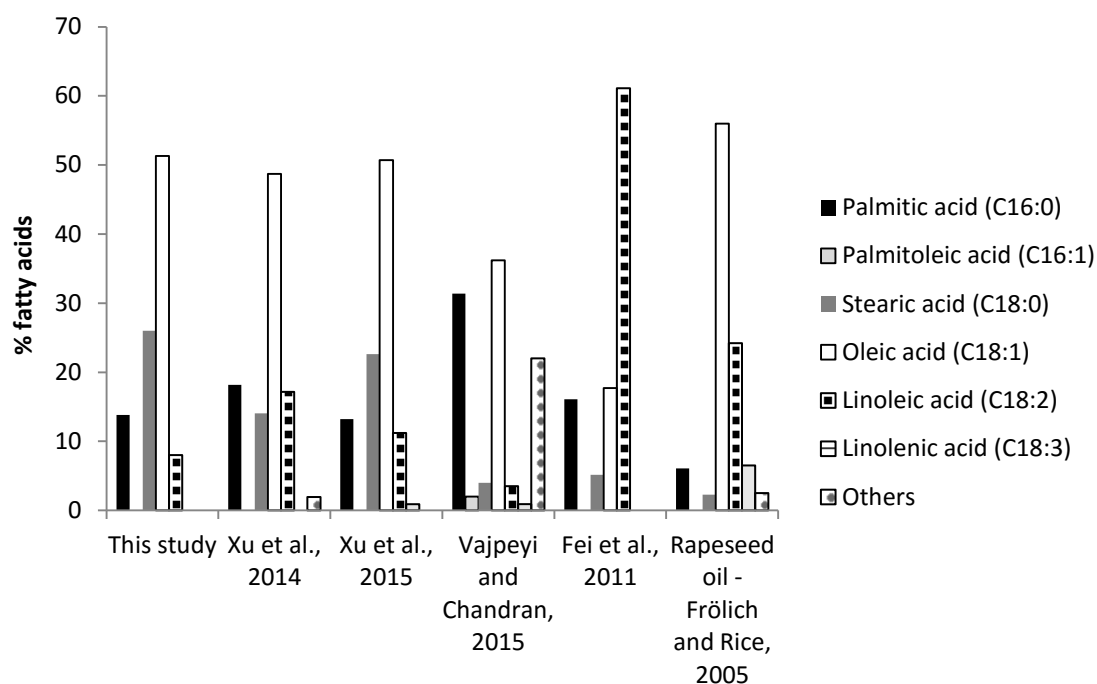
The overall yields of the culture were determined and results are shown in Table V-6.

The cell mass yield was 0.39 g of biomass produced per g of VFAs consumed. This result was close to the values obtained previously from *C. curvatus* culture on synthetic acetate and classical carbon sources such as glucose or glycerol (Anschau et al., 2014; Meesters et al., 1996). The overall lipid yield was 0.13 g/g which was in good agreement with the value obtained from already published works using VFAs (Xu et al., 2015, 2014) or other renewable sources (Uçkun Kiran et al., 2013; Wang et al., 2015).

VFAs were exhausted after only 21 hours of culture, which demonstrated that this process was efficient for the removal and the upgrading of these molecules. Studies based on renewable sources revealed longer fermentation times, even when similar initial substrate concentrations were employed (Xu et al., 2015, 2014). These results were obtained with a medium coming directly from an anaerobic fermentation compartment. Only dilution with a solution of two mineral salts was necessary. The requirement of low upstream preparation of the medium is really interesting and offers very good perspectives for an efficient coupling process.

#### 3.3.3.3. Fatty acids profile and predictions of the biodiesel quality

The main fatty acids obtained from the lipis extracted at the end of the culture were long-chained fatty acids: palmitic, stearic, oleic and linoleic acids (Figure V-7). This composition was close to the one reported for rapeseed oil currently used for biodiesel production. The proportions of each fatty acid were similar to those found in our previous works (Béligon et al., 2015) for *C. curvatus* cultures on synthetic acetate, and to those found by Xu and co-workers (Xu et al., 2015) for *C. curvatus* cultures on VFAs. Different compositions were reported for *C. albidus* grown on VFAs, with higher values of palmitic acid (Vajpeyi and Chandran, 2015) and linoleic acid (Fei et al., 2011). The composition was close to the fatty acids composition of rapeseed oil, currently used for biodiesel production (Fröhlich and Rice, 2005).



**Figure V- 7. Comparison of fatty acids profiles obtained from various *Cryptococcus* cultures on VFAs and rapeseed oil profile.**

The composition and proportions of the fatty acids contained in the lipids are very important parameters to take into account if an utilization of these lipids as biodiesel precursors is possible. Physical and chemical properties of biodiesel are dependant of the initial lipid composition. Thanks to a series of mathematical equations (Table V-3), different parameters such as cetane number, kinematic viscosity and the heat of combustion could be predicted from the fatty acid methyl esters proportions (Table V-7).

**Tableau V- 7. Predictions of cetane number, density, kinematic viscosity, heat of combustion, oxidative stability and iodine value. Comparison with European and American standards.**

		<b>Lipid production</b>	<b>European norm EN14214</b>	<b>American norm ASTM D 6751</b>
Fatty acid profile (%)	C16:0	12.2		
	C16:1	0		
	C18:0	19.1		
	C18:1	54.4		
	C18:2	14.3		
Cetane number		64	Minimum 51	Minimum 47
Density (kg/m <sup>3</sup> )		869	860-890	
Kinematic viscosity (mm <sup>2</sup> /s)		4.3	3.5-5.0	1.9-6.0
Heat of combustion (kg/J)		40		
Iodine value (g <sub>I2</sub> /100g)		71	Maximum 120	
Oxidative stability (h)		14	Minimum 6	Minimum 3

These results indicated that the lipids produced from the *C. curvatus* culture were consistent with an utilization as biodiesel precursors. The final product presented parameters values which were in good agreement with both European and American standards. This revealed that VFAs from a hydrogen production system could be used as a feedstock for lipid production but also that the final lipid composition was also suitable to be used in the biodiesel production field.

### **3.3.4. Comparison with other biorefinery studies**

This study focused on the feasibility of using a two-stage bioprocess that can produce two valuable compounds: hydrogen and microbial oils, from lignocellulosic biomass as substrate. To demonstrate the feasibility of the concept, glucose was chosen as initial substrate since it represents the main monosaccharide obtained from pretreated lignocellulosic biomass. A comparison with studies associating dark fermentation and microbial oils production is presented in Table V-8. For easier comparison between values all yields were expressed in g/g<sub>COD</sub>.

**Tableau V- 8. Comparison between biorefinery studies.**

Anaerobic fermentation (H <sub>2</sub> and/or VFAs production)						Aerobic fermentation (lipids production)						Ref.
Microorganisms	Culture mode	Substrate	Y <sub>CH4/s</sub> mL/L /h	Y <sub>H2/s</sub> mL/L /h	Y <sub>VFAs/s</sub> g/g <sub>COD</sub>	Strain	Culture mode	Substrate	Y <sub>x/s</sub> g/g <sub>COD</sub>	Y <sub>L/s</sub> g/g <sub>COD</sub>	Lipid content (%)	
						Microalga						
<i>Ethanoligenens harbinense</i> B49	B	Synthetic wastewater	-	65.5	0.585	<i>Scenedesmus</i> sp. R-16	B	Acetate, ethanol			40.9	a
Anaerobic blanket sludge (chemical wastewater)	B	Deoiled algae cake	-	1	1.19	Mixed microalgal culture	B	VFAs			26.3	b
						Fungi						
NS	C	Animal manure/ food wastes	26.7	-	-	<i>M. isabellina</i>	B	Glucose, xylose, acetate		0.15	32.8	c
						Yeasts						
Anaerobic digester sludge (wastewater treatment)	C	<i>L. japonica</i>	10	-	0.45	<i>C. curvatus</i>	B	VFAs + mannitol	0.28	0.13	50.4	d
NS	C	Raw food wastes	-	-	0.39	<i>C. albidus</i>	C	VFAs		0.03	14.9	e
Sludge (Wastewater treatment)	B	Food wastes	-	NS	NS	<i>C. curvatus</i>	C	VFAs	0.48-0.51		13.5	f
Microbial consortium	B	Glucose	-	440	0.39	<i>C. curvatus</i>	FB	VFAs	0.21	0.07	42	This study

B : batch ; C : continuous ; FB : fed-batch.

NS: not specified.

a(Ren et al., 2014); b (Venkata Subhash and Venkata Mohan, 2014); c (Zhong et al., 2015); d (Xu et al., 2015); e (Vajpeyi and Chandran, 2015); f (Chi et al., 2011)

The comparison of results obtained for anaerobic fermentation process indicated that present process is competitive with other studies. Indeed, even if  $Y_{VFAs/s}$  was lower than in some reported values (Vajpeyi and Chandran, 2015; Xu et al., 2015), an important  $H_2$  production occurred. We investigated the performance of this two-stage bioprocess from an energy conversion point of view. The heat value conversion efficiency (HVCE) and the total energy conversion efficiency (TECE) were determined as follow (Ren et al., 2014):

$$HVCE (\%) = \frac{\text{Heat value of } H_2 \text{ produced (kJ)}}{\text{Heat value of glucose consumed (kJ)}} \quad \text{Equation V-3}$$

$$TECE (\%) = \frac{\text{Heat value of } H_2 \text{ produced (kJ)} + \text{Heat value of lipids produced (kJ)}}{\text{Heat value of glucose consumed (kJ)}} \quad \text{Equation V-4}$$

The specific heat values used for the calculations of HVCE and TECE were : 15.64 kJ/g (glucose), 142 kJ/g ( $H_2$ ) and 36.3 kJ/g (lipids). Results indicated that if dark fermentation was considered alone, the HVCE was 14%. The TECE reached 21% with the addition of a lipid production step following the anaerobic fermentation, revealing that the two-stage bioprocess allowed a better energy recovery than dark fermentation alone.

The total energy conversion efficiency is then much more important in comparison with studies focused only on VFAs production. A part of this energy could be directly used for lignocellulosic biomass pretreatment. Using sugars coming from pretreated lignocellulosic biomass as carbon source may be an interesting strategy since hydrolysis of many organic substrates appeared to be the limiting step of the global process. Even for VFAs production, many types of pretreatment were used in studies presented in table V-8 (Venkata Subhash and Venkata Mohan, 2014; Zhong et al., 2015).

Among different studies, only those using co-substrates (VFAs + sugar) appeared to be more efficient than this study. At this stage of development, this process appeared already competitive with those using only VFAs as carbon source.

The main difference with algal lipids produced in heterotrophic conditions remains the global cost of the process. Vajpeyi and Chandran (Vajpeyi and Chandran, 2015) reported that the overall lipid production cost from VFA produced from food waste was US\$0.81–2.53/kg lipids. In contrast, for algal biodiesel, the cost varies between \$21/L (Ratledge and Cohen, 2008) and \$2.25/L (Davis et al., 2011) which equal respectively to \$22.6/kg and \$2.42/kg (if oleic acid density is used to convert liter to kilograms).

### 3.4. Conclusions

This study demonstrated the feasibility of this biorefinery concept which led to the production of energetic vectors and biofuels from lignocellulosic biomass (represented as glucose).

First step of this two-stage bioprocess was the production of hydrogen thanks to an anaerobic microbial consortium. A global yield of  $1.46 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$  was obtained, with a productivity which reached  $1.2 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  at its maximal value. This result was one of the most performant process in literature. A VFAs concentration of  $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  was obtained at the end of the culture, which corresponded to a yield of  $0.36 \text{ g}/\text{g}_{\text{glucose}}$ . The supernatant was then recovered thanks to a microfiltration membrane module which separated the liquid phase from the residual biomass. Near to 97% of VFAs were recovered and used as carbon source for lipid and biomass production from *C. curvatus*. The yeast was able to grow on a supernatant which was only supplemented with two mineral salts with a specific growth rate of  $0.24 \text{ h}^{-1}$ . The addition of supernatant led to a lipid accumulation of 42% in the dry cell weight. The fatty acids profile of the lipids produced was in agreement with European and American standards for biodiesel production.

**Competing interests** - The authors declare they have no competing interests.

**Acknowledgements** - This work has been sponsored by the French government research program “Investissements d’avenir” through the IMobS3 Laboratory of Excellence (ANR-10-LABX-16-01), by the European Union through the program Regional competitiveness and employment 2014-2020 (ERDF-Auvergne region) and by the Auvergne region. David Duchez is gratefully acknowledged for his help.

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Discussion autour des résultats obtenus

Les travaux présentés dans cette étude ont permis de valider le concept du procédé dans sa globalité. Ils sont extrêmement encourageants dans l'optique d'un développement de cette technologie avec des substrats plus complexes.

Même si cela dépasse le cadre de cette étude, ces travaux ont montré qu'une co-production d'H<sub>2</sub> et d'AGVs pouvait être réalisée de manière efficace sur un substrat simple qui peut être obtenu après un prétraitement de la biomasse cellulosique. L'objectif à terme sera de pouvoir orienter le métabolisme vers l'une ou l'autre des voies en fonction du « potentiel hydrogène » qui dépend directement de la composition du substrat (Thèse A. Noblecourt).

L'utilisation d'une technologie membranaire pour relier les deux compartiments a permis de soutirer du réacteur anaérobie un surnageant riche en AGVs (24,5 g/L) sans observer de colmatage important. Ces premières expériences ayant été réalisées à partir de glucose, la technologie membranaire devra être éprouvée avec des surnageants issus de matières premières plus complexes.

La taille des pores choisie a permis de retenir l'intégralité de la biomasse dans le compartiment anaérobie. Aucun développement bactérien n'a été observé lors des cultures de levures.

Aucune inhibition de culture n'a été observée. La mise au point du procédé a montré que pour initier une croissance des levures, le surnageant riche en AGVs devait être dilué afin de limiter la toxicité du substrat. Une supplémentation en ions ammonium et magnésium est alors nécessaire suite à cette dilution. La majorité des éléments nécessaires à la croissance de la levure sont donc retrouvés dans le surnageant anaérobie et pourront être directement utilisés pour la phase de production de lipides.

Ces travaux ont permis la production de biomasse levurienne (6,8 g/L) présentant une teneur en lipides maximale de 42%. La totalité du carbone contenu dans les AGVs a été assimilée pour la production de biomasse et de métabolites, ce qui est déterminant dans un concept de bioraffinerie de matière organique. La composition de ces lipides démontre la possibilité de produire un précurseur de biodiesel à partir d'un surnageant anaérobie.

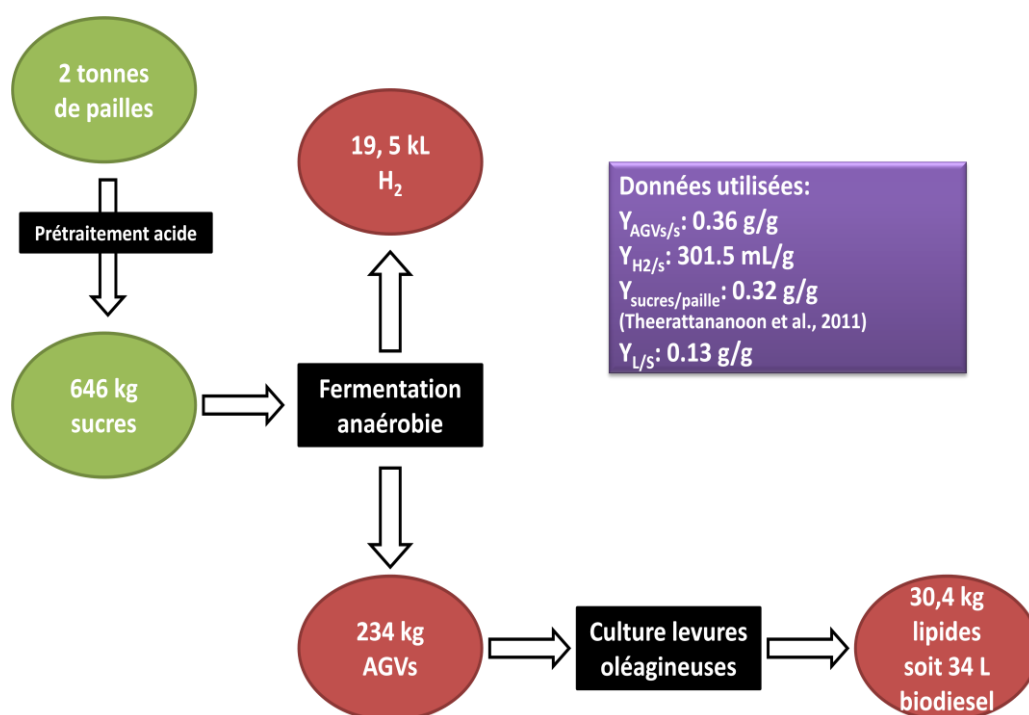
A partir des données obtenues dans cette partie de l'étude, nous avons reproduit l'exercice qui permet de calculer les quantités de substrats (biomasse lignocellulosique et AGVs) nécessaires pour la production d'un volume de biodiesel équivalent à celui issu d'un baril de pétrole (figure V-8). Ces



résultats sont valables si les performances observées au cours des cultures présentées restent identiques au cours des cultures expérimentales.

La quantité de lipides nécessaire afin de produire 34 L de biodiesel calculée dans le chapitre IV est de 30,38 kg. Les résultats obtenus (figure V-8) montrent que cette quantité de lipides peut être obtenue à partir d'une quantité initiale d'AGVs de 234 kg. 646 kg d'équivalent glucose seront alors nécessaires pour produire cette quantité d'AGVs. Cette réaction conduira également à une production de plus de 19 m<sup>3</sup> d'hydrogène.

Enfin, il est possible d'estimer qu'une quantité initiale de 2 tonnes de paille serait nécessaire pour produire les quantités énoncées d'hydrogène et de biodiesel si l'on se base sur un rendement en sucres (glucose, xylose notamment) de 30g par 100g de matière sèche après un pré-traitement de biomasse lignocellulosique (de type paille de blé) à l'acide sulfurique (Theerarattananoon et al., 2011).



**Figure V-8. Production d'hydrogène et de biodiesel à partir de biomasse lignocellulosique.**

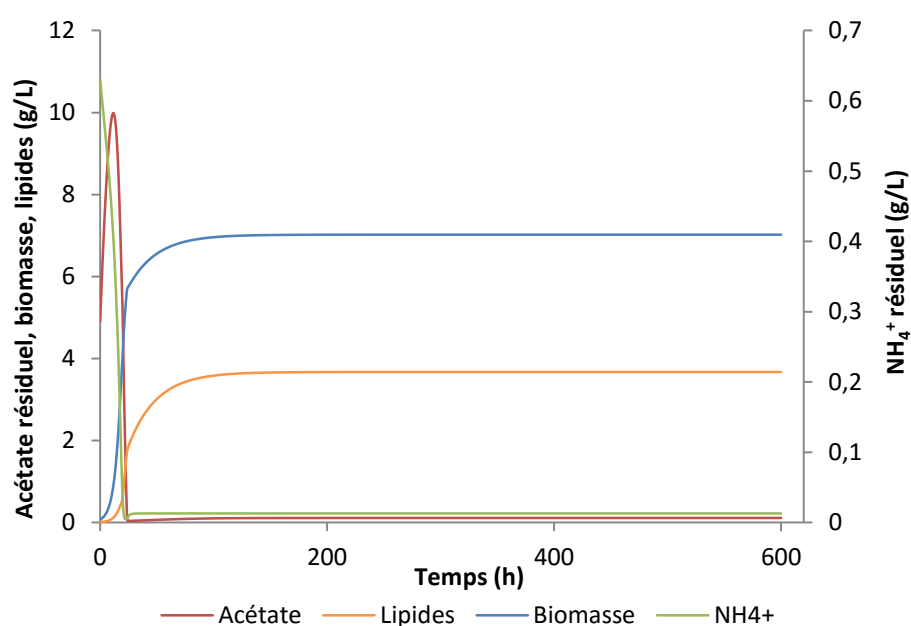
Les résultats obtenus au cours de l'étude présentée ici confirment que le projet de valorisation de la biomasse lignocellulosique par la production d'hydrogène et de lipides levuriens est possible. Il n'est

cependant pas encore assez compétitif comparativement aux procédés de production d'hydrogène et de diesel classiques. Une discussion sur les voies d'améliorations du système fait l'objet de la suite de ce chapitre.

#### 4.2. Limites posées par l'emploi d'un surnageant de culture anaérobie

Ces essais préliminaires montrent que les concentrations finales en biomasse et en lipides levuriens obtenues à la suite de la culture en fed-batch présentée dans ce dernier chapitre sont relativement faibles comparativement aux résultats obtenus au cours des cultures réalisées à partir d'acétate synthétique.

En utilisant le modèle présenté dans le chapitre IV, une simulation de culture continue a également été réalisée en considérant les concentrations en AGVs et en ions ammonium résiduels dans le surnageant issu de la fermentation anaérobie (soit respectivement 24,5 et 0,246 g/L). Les valeurs de différentes variables (biomasse, lipides, acétate, etc) obtenues avec un taux de dilution de  $0,04 \text{ h}^{-1}$  sont présentées dans la figure V-9 et les résultats sont synthétisés dans le tableau V-9.



**Figure V- 9. Simulation d'une culture continue de *C. curvatus*.**

Le taux de dilution choisi est de  $0,04 \text{ h}^{-1}$ . Les concentrations en acétate et en ions ammonium du milieu d'alimentation sont respectivement fixées à 24,5 et 0,246 g/L. Le pH est de 7, la température de  $30^{\circ}\text{C}$ .

**Tableau V- 9. Calcul sur une culture continue simulée (taux de dilution 0,04 h<sup>-1</sup>)**

Concentration en biomasse (g/L)	7,0
Concentration en lipides (g/L)	3,7
Teneur en lipides (%)	52,9
$P_X$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,28
$P_L$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,15
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,29
$Y_{L/S}$ (g/g)	0,15

Bien que le modèle présenté dans cette étude ne puisse prédire l'évolution des concentrations en biomasse, lipides et autres variables à partir d'un mix d'AGVs puisqu'il a été conçu pour simuler des cultures menées sur acétate pur, il nous permet cependant de savoir dans quelles échelles se situent ces concentrations. Ainsi, lors de cultures continues avec de telles concentrations en acétate et en ions ammonium en entrée de réacteur, de faibles concentrations en biomasse et en lipides, ainsi que de faibles productivités sont attendues. Nous pouvons par exemple nous attendre à avoir des résultats de productivité situés dans une gamme de valeurs 3,5 fois moins importante que la productivité maximale obtenue dans des conditions optimisées sur acétate pur.

Ces faibles valeurs, que les cultures soient menées selon un mode discontinu ou continu, constituent par conséquent des verrous à une industrialisation de ce bioprocédé. L'une des limites du procédé actuel conditionnant les concentrations finales en biomasse et en lipides reste la concentration en AGVs permettant d'alimenter le réacteur aérobie.

La solution envisagée afin d'augmenter les performances du couplage de procédés serait de passer par une étape de concentration de la solution d'AGVs en sortie de réacteur anaérobie. Cette augmentation de la concentration d'AGVs dans la solution d'alimentation permettrait :

- (i) de fournir une quantité plus importante de source carbonée pour la phase de croissance et atteindre des concentrations en biomasse élevées
- (ii) d'augmenter le rapport C/N du milieu lorsque l'on veut induire l'accumulation de lipides
- (iii) de maintenir une concentration en lipides élevée et éviter le turnover lipidique observé dans la culture en fed-batch présentée en partie 3.
- (iv) enfin, dans le cas d'une culture continue, l'augmentation des concentrations en source carbonée dans le milieu d'alimentation permettrait d'obtenir des productivités intéressantes.

### 4.3. Méthodes envisageables pour la concentration des AGVs

Afin d'augmenter la concentration en AGVs dans les solutions d'alimentation, il est possible d'agir à différentes étapes du bioprocédé :

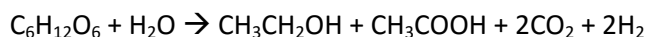
- Lors de la synthèse des AGVs au cours de la fermentation anaérobie
- Après récupération du surnageant par filtration membranaire

#### 4.2.1. Augmentation de la concentration d'AGVs au cours de la fermentation anaérobie

Lors de la fermentation anaérobie, deux voies métaboliques principales sont employées afin de produire de l'hydrogène ainsi que des AGVs à partir d'hydrates de carbone :

- La voie acétate :  $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$
- La voie butyrate :  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$

Une autre voie est également possible, via la production d'acétate et d'éthanol :



Le pH est par exemple un paramètre clé influant sur la production d'AGVs au cours de la fermentation anaérobie (Infantes et al., 2011; Rodríguez et al., 2006). La production d'acide acétique est notamment favorisée lorsque le pH est égal à 4 tandis que la production d'acide butyrique est plus importante à pH 5 (Infantes et al., 2011). D'autres paramètres peuvent être utilisés afin d'augmenter les teneurs finales en AGVs. Cependant une concentration trop élevée d'AGVs dans le milieu de culture anaérobie impacte négativement la production d'hydrogène. Des travaux réalisés dans le cadre d'une autre étude ont montré que le débit de biogaz est considérablement diminué lorsque la concentration en AGVs excède 20 g/L. Or l'intérêt du couplage des deux compartiments passe certes par une optimisation de la production d'AGVs pour la production de lipides mais aussi et surtout par une production d'hydrogène importante. Il ne s'agit donc pas de favoriser un compartiment en particulier au détriment du second.

Nous avons par conséquent choisi de réfléchir à une méthode de concentration des AGVs après l'étape de fermentation anaérobie et de récupération du surnageant.

#### 4.2.2. Méthodes de séparation des AGVs

Il existe actuellement différentes techniques physiques et chimiques recensées dans la littérature permettant de séparer les AGVs. Les principales méthodes, leurs avantages, inconvénients et coûts associés, sont présentés dans le tableau V-10. Le choix de la méthode employée va dépendre de la nature de(s) acide(s) carboxylique(s) désiré(s), de la concentration finale de ces acides mais également du degré de pureté souhaité.

Les méthodes d'adsorption et d'électrodialyse pour la récupération d'acides carboxyliques sont peu employées dans l'industrie due à leur caractère énergivore, contrairement aux techniques utilisant des solvants organiques. En effet, les techniques d'extraction liquide/liquide sont largement utilisées dans l'industrie chimique, alimentaire et pharmaceutique afin de séparer et de récupérer les fractions d'intérêt. Ces méthodes de séparation peuvent également être envisagées *in situ*, c'est-à-dire de façon intégrée aux fermentations anaérobies. Ces fermentations sont dans ce cas qualifiées de fermentations extractives. La séparation des composés d'intérêt est réalisée directement dans le réacteur (extraction par solvant) ou par circulation du milieu de fermentation dans une unité de séparation externe (adsorption, électrodialyse). Cependant, la séparation *in situ* des AGVs est parfois réalisée au détriment de la productivité du réacteur en raison de la toxicité des solvants employés ainsi que du risque d'élimination des nutriments. De plus, afin de faciliter l'extraction des AGVs, la fermentation extractive doit être opérée à un pH optimal qui n'est pas toujours celui des réactions ayant lieu dans le réacteur, ce qui peut influencer négativement la productivité de celui-ci.

**Tableau V- 10. Méthodes envisageables pour la séparation des AGVs du milieu de fermentation.**

Méthode Référence	Description	Avantages	Inconvénients	Aspect économique
<b>Précipitation</b> (Berglund et al., 1991; Datta et al., 1992; Datta and Henry, 2006; Kertes and King, 1986)	Des sels de calcium ( $\text{CaO}$ ou $\text{CaCO}_3$ ) sont ajoutés au milieu afin de neutraliser l'acide. La solution de carboxylates de calcium est ensuite concentrée par évaporation, cristallisée puis ces cristaux sont récupérés.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fait partie des méthodes les plus employées pour la récupération des acides carboxyliques.</li> <li>- Degré de pureté élevé</li> <li>- Rendement élevé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessite l'utilisation d'acide sulfurique <math>\text{H}_2\text{SO}_4</math> afin de libérer les acides carboxyliques</li> <li>- Génère un déchet solide (<math>\text{CaSO}_4</math>) devant être pris en charge par des sites d'enfouissement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coût d'investissement faible</li> </ul>
<b>Distillation</b> (Datta and Henry, 2006)	De l'ammoniac $\text{NH}_3$ est utilisé afin de neutraliser les acides. De l'alcool est ensuite rajouté au mélange afin de former des esters, qui sont ensuite séparés du milieu par distillation.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Degré de pureté élevé</li> <li>- Le coproduit formé (<math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math>) peut être valorisé via la production d'engrais ou dans l'industrie chimique.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessite l'hydrolyse des esters et une étape de distillation afin de séparer l'alcool des acides carboxyliques.</li> <li>- Coût du procédé nécessitant de réaliser une économie d'échelle</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coût d'investissement élevé</li> <li>- Energivore</li> </ul>
<b>Adsorption</b> (Cao et al., 2002)	Une résine échangeuse d'ions est utilisée afin d'adsorber les acides carboxyliques présents dans le milieu. Les acides sont ensuite élués ou désorbés à l'aide de méthanol, d'ammoniac ou d'acide sulfurique.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mise en œuvre facile</li> <li>- Méthode connue</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible capacité d'adsorption (moins de <math>100 \text{ mg}_{\text{acides}}/\text{g}</math> de résine)</li> <li>- Présence d'anions dans le milieu entrant en compétition pour les sites actifs de la résine.</li> <li>- Séparation peu sélective</li> <li>- Utilisation de produits chimiques supplémentaires afin d'acidifier le milieu ainsi que pour l'étape d'éluion/désorption.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coût de la résine élevée</li> <li>- La régénération de la résine est un procédé énergivore</li> </ul>

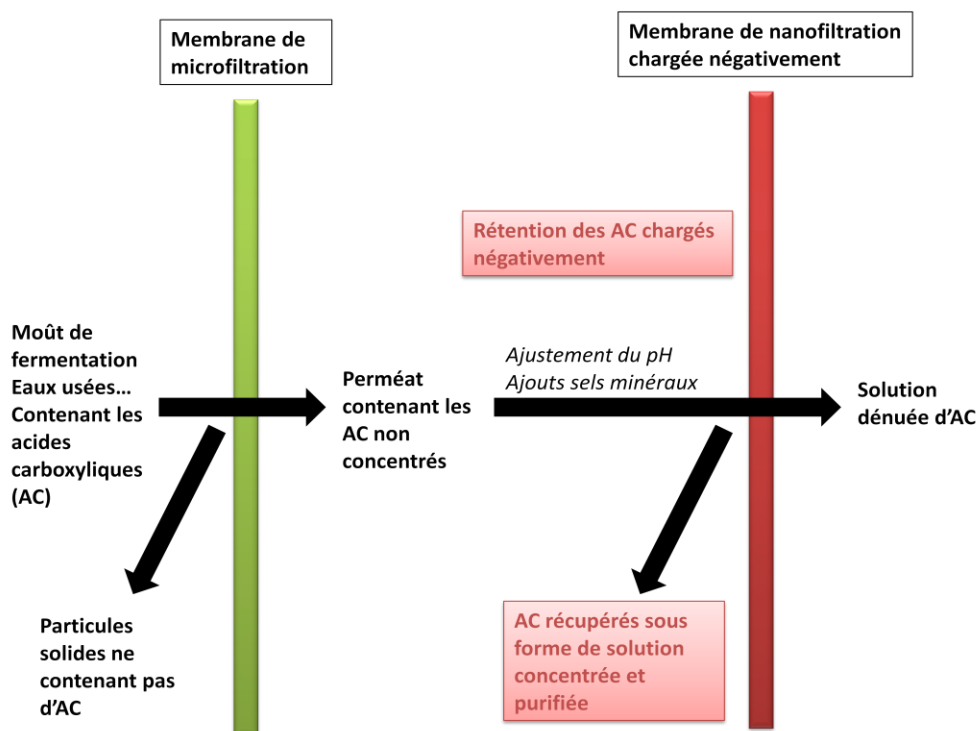
<b>Electrodialyse</b> (Vertova et al., 2009)	Un courant électrique est appliqué afin de déplacer les ions carboxylates chargés négativement d'une membrane échangeuse d'anions vers l'anode d'un électrodialyseur.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Obtention d'une solution concentrée d'acides libres sans utiliser d'acide sulfurique.</li> <li>- Peut être appliqué à une large gamme d'acides : acétique, butyrique, propionique, citrique, formique etc.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Importante présence d'impuretés et peut nécessiter une phase de purification supplémentaire</li> <li>- Risque d'encrassement de la résine par des cations divalents, nécessitant de réduire leurs concentrations à 1-5 ppm.</li> <li>- Energivore</li> </ul>	- Procédé énergivore
<b>Extraction par solvant</b> (Juang et al., 1997; Yang et al., 1991)	Utilisation de solvants organiques (de type amines secondaires et tertiaires) afin d'extraire les acides carboxyliques du milieu.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible coût</li> <li>- Rendement élevé</li> <li>- Méthode la plus adaptée si des sels de carboxylate sont désirés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessité d'acidifier la solution afin de permettre une extraction efficace d'acides libres.</li> <li>- Les extractants doivent être régénérés par distillation ou par stripping.</li> </ul>	- Consomme moins d'énergie que les méthodes d'adsorption et d'électrodialyse
	Variante possible : utilisation d'une membrane liquide supportée. Le solvant d'extraction est immobilisé dans les pores d'une membrane en polymère, permettant ainsi d'avoir une large surface de contact assurant un transfert de masse efficace.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Transfert de masse plus efficace que l'extraction par solvant sans membrane</li> <li>- Possibilité de combiner extraction des acides et stripping</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible stabilité des membranes liquides supportées</li> <li>- Efficacité de l'extraction pH-dépendante : nécessité d'acidifier le milieu avant l'extraction.</li> </ul>	- Facilement transposable à grande échelle.
<b>Séparation membranaire</b> (Choi et al., 2008; Zacharof et al., 2016; Zacharof and Lovitt, 2014)	Utilisation de membranes à seuils de coupure différents afin d'éliminer les particules solides d'un effluent et de séparer les fractions résiduelles pour récupérer les composés désirés	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Technologie en plein essor</li> <li>- Rendement élevé</li> <li>- Applicable à de nombreuses applications</li> <li>- Peu énergivore</li> <li>- Facilement transposable à grande échelle</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colmatage et encrassement des membranes de filtration</li> <li>- Encore peu utilisé dans les systèmes complexes</li> </ul>	- Coûts d'investissement et d'entretien élevés

L'une des méthodes émergentes de récupération et de concentration des acides organiques à partir de milieu de fermentation ou d'eaux usées consiste en l'utilisation de membranes de filtration (Choi et al., 2008; Zacharof et al., 2016; Zacharof and Lovitt, 2014). L'idée est de soumettre les effluents de fermentation ou d'eaux usées à une microfiltration membranaire permettant de retirer les particules solides du milieu et d'obtenir un perméat composé d'une solution clarifiée contenant les acides carboxyliques. Dans un second temps, après addition de sels minéraux et ajustement du pH favorisant la rétention des molécules d'intérêt, la solution est soumise à une deuxième filtration (nanofiltration) membranaire. La nanofiltration est un procédé baromembranaire qui couvre un domaine de séparation intermédiaire entre l'ultrafiltration et l'osmose inverse. Les matériaux utilisés pour la conception des membranes (comportant pour la plupart des charges électriques) et la structure des membranes, présentant des pores de diamètre de l'ordre du nanomètre, confèrent à la nanofiltration des propriétés très particulières. En effet, le transfert des espèces à travers la membrane va dépendre de plusieurs paramètres : la taille, la charge électrique, la nature et la concentration des espèces. Le type de membranes de nanofiltration le plus adapté pour la séparation des acides carboxyliques englobe les membranes organiques chargées électriquement en surface, capables par un phénomène de répulsion d'empêcher le transfert des acides.

Différentes membranes de nanofiltration existent et leur efficacité pour la séparation des acides carboxyliques présents dans des milieux synthétiques mais également dans des milieux « réels » de type boues agricoles et eaux usées a été testée et validée (Choi et al., 2008; Zacharof and Lovitt, 2014). Les membranes de nanofiltration, chargées négativement, permettent une rétention efficace des acides carboxyliques si ceux-ci sont présents sous leur forme basique (donc si le milieu à traiter est à pH neutre ou basique). De cette façon, les acides peuvent être récupérés sous la forme d'une solution concentrée et purifiée (figure V-10).

Ce système permet à Zacharof et Lovitt (2014) d'obtenir, à partir de solutions d'acétate (concentration initiale de 21,10 mM) et de butyrate (concentration initiale de 15,81 mM), des rétentats présentant des concentrations de 53,94 mM pour l'acétate et 28,38 mM pour le butyrate. Des taux de rétention des acides acétiques et butyriques de 70% sont obtenus suite à l'emploi de membranes de nanofiltration LF10 (Nitto Denko, Japon) pour le traitement de boues agricoles (Zacharof et al., 2016).

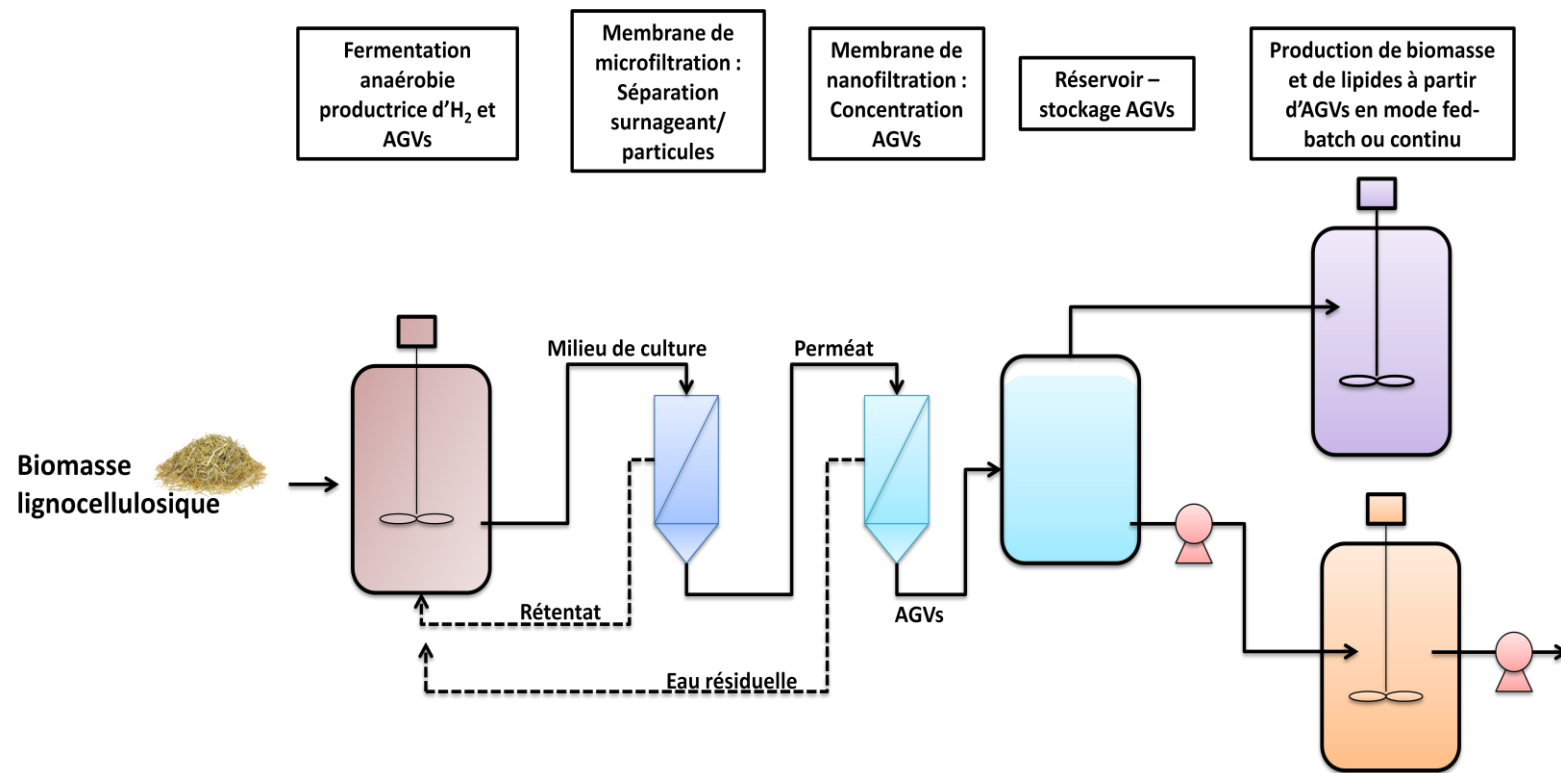




**Figure V- 10. Séparation membranaire des AGVs à partir d'un milieu complexe (d'après Zacharof et al., 2016).**

Les particules solides sont dans un premier temps éliminées par une membrane de microfiltration. Après ajouts de sels minéraux, le perméat subit une deuxième filtration, cette fois avec une membrane de nanofiltration, à pH neutre ou alcalin. Les acides sont retenus sous forme de solution concentrée et purifiée.

Ces différentes techniques de séparation et de concentration des AGVs devront être étudiées et testées dans le cadre de perspectives à ce travail afin d'améliorer les performances des cultures de levures à partir de surnageant anaérobie. L'utilisation de technique de nanofiltration (précédée d'une microfiltration déjà en place) semble être cependant une voie qui se détache dans le cadre de notre procédé (figure V-11). Même si l'investissement et le coût d'entretien restent élevés, l'absence d'utilisation de solvant et la possibilité de recycler la fraction liquide en tête de compartiment anaérobie pour l'incorporation de fractions solides sont des atouts intéressants. Pour que le procédé fonctionne de manière optimale, il sera également primordial de bien dimensionner chacun des deux compartiments.



**Figure V- 11. Schéma du procédé de couplage.**

La biomasse lignocellulosique est utilisée en tant que substrat initial pour le procédé de couplage mis au point. Après une étape de dégradation anaérobie productrice d'hydrogène et d'AGVs, le milieu de culture est filtré via une membrane de microfiltration. Les particules solides (biomasses lignocellulosique et bactérienne) sont renvoyées dans le compartiment anaérobie tandis que le perméat (surnageant contenant les AGVs non concentrés) est envoyé vers un module de nanofiltration. Ce système permet la rétention et la concentration des AGVs qui sont alors stockés. Ils sont ensuite utilisés comme source de carbone pour la production de biomasse et de lipides par la levure oléagineuse *Cryptococcus curvatus* selon deux modes de culture envisageables : continu et fed-batch. Le filtrat (eau résiduelle) peut ainsi être renvoyé vers le premier compartiment et être utilisé comme milieu de culture pour la dégradation de biomasse lignocellulosique.

#### 4.4. Conclusions

Ce travail a permis de mettre en évidence la possibilité d'utiliser le surnageant de culture anaérobie comme milieu de production de biomasse et de lipides levuriens. La levure *C. curvatus* est capable d'assimiler les différents AGVs présents dans le surnageant. Aucun inhibiteur de croissance n'a été identifié au cours des cultures. Les performances en termes de production de biomasse sont très intéressantes puisque des rendements en biomasse et des taux de croissance maximaux similaires à ceux de cultures sur acétate synthétique ont été obtenus. Un milieu de culture minimum a été mis au point afin de limiter les ajouts d'éléments minéraux dans le surnageant. Ainsi il a été déterminé que seuls les sulfates d'ammonium et de magnésium devaient être rajoutés au surnageant afin de permettre une croissance de la souche sur ces substrats complexes.

Le bioprocédé à deux compartiments a également été mis à l'œuvre afin de vérifier sa faisabilité. Ainsi, à partir d'une quantité initiale de glucose, représentant des monomères de sucres obtenus par hydrolyse de la biomasse lignocellulosique, près de 60 L de biohydrogène et 7 g/L de biomasse levurienne présentant une teneur en lipides maximale de 42% ont été obtenus. Les principaux verrous identifiés pour l'amélioration de ce bioprocédé résident dans la capacité à concentrer les AGVs présents dans le surnageant et dans la recherche des voies d'amélioration du système. Cependant, les premiers résultats obtenus suite à cette étude sont prometteurs et laissent présager de belles perspectives à ce bioprocédé.

## **CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES**

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet de valorisation de la biomasse lignocellulosique par la production de biohydrogène suivie d'une production de lipides levuriens précurseurs de biocarburants. Cette démarche trouve son originalité dans la mise au point d'un bioprocédé consistant à relier deux compartiments où se déroulent, dans l'un, la fermentation anaérobie productrice d'hydrogène et d'AGVs (acétate, propionate et butyrate), et dans l'autre la culture aérobie de levures oléagineuses à partir des AGVs pour la production de lipides. Ces deux compartiments sont liés entre eux par une membrane permettant la séparation biomasse/surnageant du milieu de culture anaérobie. Ce surnageant contenant les AGVs est alors soutiré pour être apporté dans le deuxième compartiment, siège de la production de biomasse et de lipides levuriens. L'objectif global de cette thèse est la mise au point d'un procédé de production de biomasse et de lipides efficace par la levure oléagineuse *Cryptococcus curvatus* à partir d'AGVs. L'une des contraintes liées à l'utilisation de ces substrats complexes est qu'ils présentent une toxicité élevée vis-à-vis des microorganismes. Cette contrainte entraîne alors la nécessité de piloter ce procédé de manière particulièrement fine, selon un mode fed-batch ou continu, afin d'envisager à terme une industrialisation de ce procédé.

Les premiers travaux de cette étude ont été réalisés en utilisant un substrat modèle, l'acétate. Celui-ci a été choisi pour sa représentativité dans les mélanges d'AGVs produits lors de procédés de digestion anaérobie.

La première partie de ce travail a porté sur l'étude des paramètres opératoires influençant la production de biomasse et de lipides à partir d'acétate en utilisant un procédé de type fed-batch. Les premiers essais de culture en fed-batch à partir d'acétate ont permis de valider la faisabilité de ce projet, cependant les cinétiques de croissance ainsi que les concentrations en biomasse et en lipides finales n'étaient pas compatibles avec une mise à l'échelle industrielle. L'objectif a donc été la mise au point d'une stratégie de culture permettant d'améliorer les performances de la souche *C. curvatus* cultivée sur acétate. Pour cela, différents paramètres opératoires ont été étudiés, en particulier le pH de culture, le mode d'alimentation du réacteur ainsi que le rapport C/N du milieu permettant de maximiser l'accumulation de lipides. Les modifications de ces paramètres ont permis d'améliorer les cinétiques et rendements en biomasse et en lipides obtenus lors des cultures en fed-batch sur acétate. Près de 80 g/L de biomasse ont ainsi pu être produits en 60h de fermentation correspondant à un rendement en biomasse de 0,47 g/g, avec un taux de croissance maximal de 0,26 h<sup>-1</sup>. La phase d'accumulation de lipides a permis d'obtenir, grâce à des C/N très élevés, variant de 300 à 900, une teneur en lipides maximale de 60% ainsi qu'un rendement en lipides global de 0,18 g/g. Ces performances, réalisées à partir d'un substrat complexe, sont très proches de celles présentées par la même levure sur glucose (Zhang et al., 2011).

La deuxième partie de ce manuscrit s'est intéressée à l'aspect productivité volumique horaire en lipides et en biomasse de la levure *C. curvatus* cultivée sur acétate, obtenue à partir de cultures réalisées en continu. Bien que les cultures en fed-batch soient le mode de culture le plus exploité industriellement, il est important de s'intéresser à ce mode de culture continu qui permet d'obtenir non seulement des productivités volumiques horaires importantes mais également d'étudier avec finesse l'impact d'un changement de paramètres opératoires sur la production de biomasse et de lipides. L'objectif de ce chapitre a donc été l'étude de l'influence de certains paramètres (taux de dilution, limitations nutritionnelles) sur l'accumulation de lipides et la production de biomasse à partir d'acétate. Dans un premier temps, un modèle de croissance et de production de lipides a été construit à partir de cultures en fed-batch et a ensuite été utilisé en tant qu'outil de prédiction. Grâce aux simulations réalisées, un taux de dilution de  $0,04 \text{ h}^{-1}$  a été identifié comme le plus favorable pour l'accumulation de lipides et pour la croissance de la souche. Le rapport C/N de 50 a également été identifié comme étant le plus intéressant afin de produire une concentration en lipides importante sans perte de substrat. Les simulations ont également permis de confirmer qu'un rapport C/N de 10 permettait la production de biomasse sans accumulation de lipides. Une culture expérimentale menée en respectant les paramètres opératoires identifiés par les simulations a permis d'obtenir des productivités volumiques horaires en biomasse et en lipides de, respectivement,  $1,07$  et  $0,54 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Ces valeurs sont bien plus élevées que celles reportées pour d'autres cultures continues de levures oléagineuses sur des substrats simples. Cependant, bien que ces productivités soient élevées, les rendements en biomasse et en lipides sont plus faibles que ceux obtenus lors des cultures en fed-batch. L'une des perspectives de ce travail sera d'améliorer ces rendements afin que le substrat soit utilisé et converti de façon plus efficace en composés d'intérêt.

Une comparaison des principaux résultats obtenus en culture discontinue et continue a permis de mettre en évidence les atouts et les inconvénients de chacun de ces modes de culture, en termes de temps, productivité et rendements. Le choix du mode de culture va donc faire l'objet d'un compromis entre les différents aspects considérés. Il dépendra également du substrat réel, en effet certaines caractéristiques notamment la concentration en AGVs présents dans le surnageant auront pour conséquence la modification de certains paramètres de culture. Nous pouvons conclure que ces deux modes de cultures sont compatibles avec la production de biomasse et de lipides envisagée à partir d'acétate. Nous avons pu vérifier que les compositions en lipides issues de ces deux modes de culture étaient très similaires et que le choix d'un mode de culture par rapport à l'autre ne pénaliserait pas l'emploi qu'il sera fait de ces lipides.

Enfin, la dernière partie s'est intéressée à l'utilisation du substrat « réel », c'est-à-dire du surnageant de culture anaérobie contenant les AGVs, pour la croissance et la production de lipides par *C.*

*curvatus*. Ce travail a notamment permis de mettre en évidence que seuls des ajouts en sulfate d'ammonium et de magnésium étaient nécessaires afin d'obtenir des cinétiques et des rendements en biomasse similaires à ceux obtenus lorsque tous les minéraux présents dans le milieu synthétique étaient apportés. De plus, les cultures menées à partir de surnageant de fermentation anaérobie ont permis d'obtenir des cinétiques de croissances similaires à celles obtenues à partir d'acétate synthétique. La production de lipides a également été vérifiée lors d'une culture en fed-batch. Une teneur en lipides maximale de 40% a ainsi pu être obtenue suite à cette culture. La composition de ces lipides s'est révélée être compatible avec une utilisation comme précurseurs de biodiesel. Nous avons ainsi pu vérifier que ce procédé de production de biomasse et de lipides à partir de substrat « réel » était réalisable. Cependant, les faibles concentrations en biomasse et en lipides obtenues à l'issue de ces cultures sur surnageant anaérobie sont peu compatibles avec l'idée d'une mise à l'échelle industrielle de ce projet. Ces valeurs faibles découlent de la concentration peu importante d'AGVs contenus dans le surnageant de culture anaérobie. Afin de pouvoir aller plus loin dans la mise au point de stratégie de culture à partir de ces surnageants, il va donc être nécessaire de concentrer ces AGVs afin d'augmenter les concentrations finales en biomasse et en lipides. Différentes techniques de concentration/séparation de ces molécules existent et devront alors être testées. Ceci fait également partie des perspectives de ce travail.

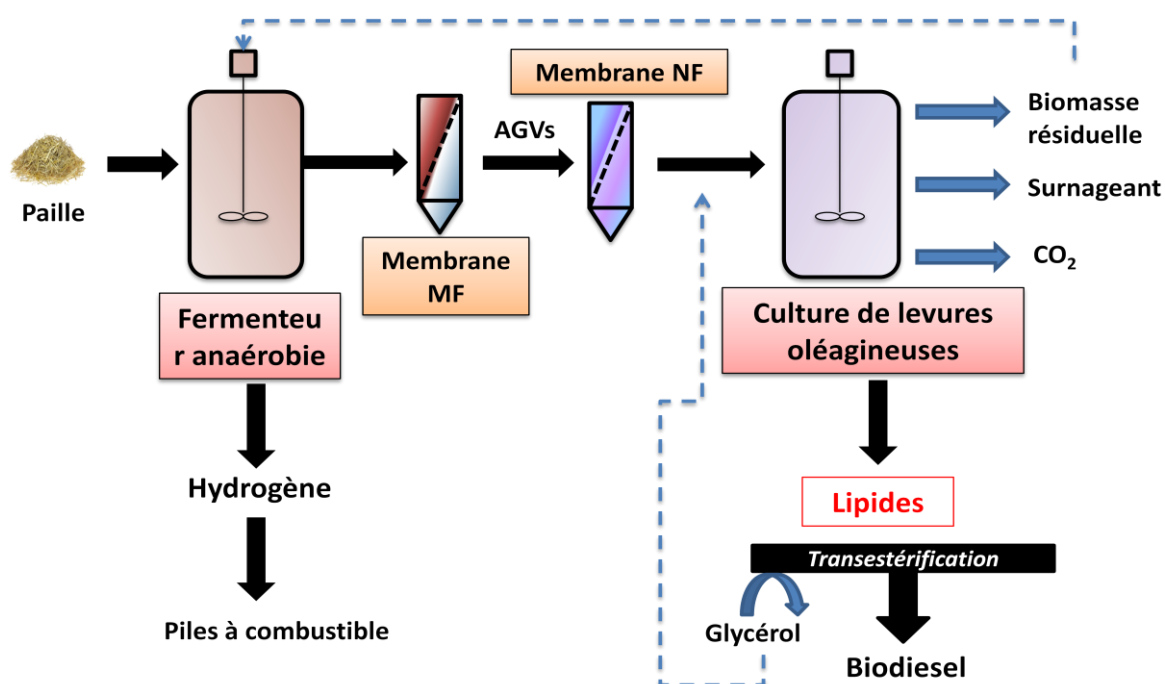
Nous pourrions alors déterminer quelle concentration d'AGVs pourra être disponible pour l'élaboration des solutions d'alimentation. Ce critère sera d'ailleurs potentiellement décisif pour le choix du mode de culture final. Cette modification de concentrations des sources carbonées est susceptible d'impacter les stratégies de culture qu'il faudra alors modifier. Pour mener à bien la suite de ce travail, le modèle de croissance et de production de lipides préalablement construit devra également être complété en intégrant les nouvelles sources de carbone (propionate et butyrate).

Ce travail s'inscrit dans une démarche globale de bioraffinerie où la biomasse lignocellulosique est utilisée comme substrat initial afin de produire un vecteur énergétique et des lipides précurseurs de biodiesel. Afin d'amplifier ce concept, il sera nécessaire d'adapter certaines étapes du projet à cette philosophie mais également de gérer l'après, c'est-à-dire le devenir des déchets et la réutilisation des coproduits.

L'extraction des lipides et la transestérification en particulier sont des techniques utilisant des solvants organiques (choloroforme, méthanol, boron trifluoride) dont l'élimination après utilisation requiert des aménagements spéciaux du fait de leur caractère toxique pour l'environnement et la santé humaine. Des travaux rapportés dans la littérature montrent que l'utilisation de solvants

« verts », moins nocifs pour l'environnement et la santé humaine (liquides ioniques, terpènes), permet une extraction de lipides aussi efficace que celle obtenue avec l'utilisation de solvants classiques (Dejoye Tanzi et al., 2013). Cette étape d'extraction de lipides pourra cependant être éliminée puisque des travaux ont révélé que la transestérification directe des lipides à partir de la biomasse levurienne et microalgale permettait une estérification des acides gras et donc la production de biodiesel (Johnson and Wen, 2009; Liu and Zhao, 2007). Cette possibilité pourra être testée afin de compléter ces travaux. L'étape d'extraction de lipides sera donc effectuée de façon ponctuelle afin de contrôler la concentration en lipides au cours de la culture.

Le devenir des principaux produits issus des cultures de levures oléagineuses à partir d'acétate que sont (i) la biomasse résiduelle, (ii) le surnageant de culture aérobie, (iii) le CO<sub>2</sub> et (iv) le glycérol issu de la transestérification devra être considéré. Chacune de ces fractions peut connaître un devenir « local » (directement dans le projet de valorisation de biomasse lignocellulosique) ou une réutilisation ultérieure (figure VI-1).



**Figure VI- 1. Valorisation de la biomasse lignocellulosique par production d'hydrogène et de lipides précurseurs de biodiesel et devenir des fractions résiduelles.**

Par exemple, la biomasse résiduelle obtenue suite à l'extraction de lipides (ou leur transestérification directe) peut être utilisée comme source de carbone dans le premier compartiment de fermentation anaérobie mais peut également être envisagée comme point de départ pour la production de



complément nutritionnel animal du fait de sa richesse en acides aminés et vitamines. Le surnageant de culture et celui issu des étapes de concentrations pourront être recyclés en tête de process afin de diluer les intrants solides. Le CO<sub>2</sub> produit au cours des cultures peut être utilisé pour flusher la membrane du réacteur anaérobie afin d'éviter le colmatage des fibres par les particules solides présentes dans le réacteur anaérobie. Il peut également être employé comme source de carbone pour la culture de microalgues autotrophes. Enfin, le glycérol produit à l'issue de la transestérification constitue une source de carbone assimilable par des microorganismes et peut constituer le point de départ de nouvelles valorisations. Il peut également être apporté au surnageant de culture anaérobie riche en AGVs afin d'augmenter encore la concentration en carbone de celui-ci. Cette étape permettra alors peut-être alors de s'affranchir de l'étape de nanofiltration. La réalisation d'une analyse de cycle de vie sur ce procédé permettra de mieux rendre compte des bénéfices associés à ce type de projet de bioraffinerie et d'orienter ces perspectives de travail afin d'améliorer encore ce procédé de couplage de production de vecteurs énergétiques.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abalde, J., Fabregas, J., Herrero, C., 1991.  $\beta$ -Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. *Bioresour. Technol., Algal biotechnology* 38, 121–125. doi:10.1016/0960-8524(91)90142-7
- Ahmad, A.L., Yasin, N.H.M., Derek, C.J.C., Lim, J.K., 2011. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15, 584–593. doi:10.1016/j.rser.2010.09.018
- Ajanovic, A., 2011. Biofuels versus food production: Does biofuels production increase food prices? *Energy* 36, 2070–2076. doi:10.1016/j.energy.2010.05.019
- Alabdulkarim, B., Bakeet, Z.A.N., Arzoo, S., 2012. Role of some functional lipids in preventing diseases and promoting health. *J. King Saud Univ. - Sci.* 24, 319–329. doi:10.1016/j.jksus.2012.03.001
- Alaswad, A., Dassisti, M., Prescott, T., Olabi, A.G., 2015. Technologies and developments of third generation biofuel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 51, 1446–1460. doi:10.1016/j.rser.2015.07.058
- Alfenore, S., Molina-Jouve, C., Guillouet, S.E., Uribe Larrea, J.-L., Goma, G., Benbadis, L., 2002. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 67–72. doi:10.1007/s00253-002-1092-7
- André, A., Chatzifragkou, A., Diamantopoulou, P., Sarris, D., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Papanikolaou, S., 2009. Biotechnological conversions of bio-diesel-derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Eng. Life Sci.* 9, 468–478. doi:10.1002/elsc.200900063
- Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., Guebitz, G.M., 2008. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 99, 3051–3056. doi:10.1016/j.biortech.2007.06.045
- Anschau, A., Xavier, M.C.A., Hernalsteens, S., Franco, T.T., 2014. Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Bioresour. Technol.* 157, 214–222. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.104
- Atabani, A.E., Silitonga, A.S., Badruddin, I.A., Mahlia, T.M.I., Masjuki, H.H., Mekhilef, S., 2012. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16, 2070–2093. doi:10.1016/j.rser.2012.01.003
- Bakonyi, P., Nemestóthy, N., Simon, V., Bélafi-Bakó, K., 2014. Fermentative hydrogen production in anaerobic membrane bioreactors: A review. *Bioresour. Technol.* 156, 357–363. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.079
- Balat, M., Balat, H., 2008. A critical review of bio-diesel as a vehicular fuel. *Energy Convers. Manag.* 49, 2727–2741. doi:10.1016/j.enconman.2008.03.016
- Béligon, V., Poughon, L., Christophe, G., Lebert, A., Larroche, C., Fontanille, P., 2015. Improvement and modeling of culture parameters to enhance biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* grown on acetate. *Bioresour. Technol.* 192, 582–591. doi:10.1016/j.biortech.2015.06.041
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribe Larrea, J.-L., Molina-Jouve, C., Nicaud, J.-M., 2009a. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog. Lipid Res.* 48, 375–387. doi:10.1016/j.plipres.2009.08.005
- Beopoulos, A., Chardot, T., Nicaud, J.-M., 2009b. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie, Lipids for the future from agro-resources to human health* 91, 692–696. doi:10.1016/j.biochi.2009.02.004
- Berglund, K.A., Elankovan, P., Glassner, D.A., 1991. Carboxylic acid purification and crystallization process. US5034105 A.
- Birch, E.E., Garfield, S., Castañeda, Y., Hughbanks-Wheaton, D., Uauy, R., Hoffman, D., 2007. Visual acuity and cognitive outcomes at 4 years of age in a double-blind, randomized trial of long-

- chain polyunsaturated fatty acid-supplemented infant formula. *Early Hum. Dev.* 83, 279–284. doi:10.1016/j.earlhumdev.2006.11.003
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917. doi:10.1139/o59-099
- Bogaert, I.N.A.V., Maeseneire, S.L.D., Vandamme, E.J., 2009. Extracellular Polysaccharides Produced by Yeasts and Yeast-Like Fungi, in: Satyanarayana, T., Kunze, G. (Eds.), *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer Netherlands, pp. 651–671.
- Bowles, R.D., Hunt, A.E., Bremer, G.B., Duchars, M.G., Eaton, R.A., 1999. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimisation of docosahexaenoic acid production. *J. Biotechnol., Biotechnological Aspects of Marine Sponges* 70, 193–202. doi:10.1016/S0168-1656(99)00072-3
- Bullock, J.D., Kristiansen, B., 1989. *Basic Biotechnology*, Academic Press. ed. Saunders College Publishing/Harcourt Brace, London.
- Cao, X., Yun, H.S., Koo, Y.-M., 2002. Recovery of l-(+)-lactic acid by anion exchange resin Amberlite IRA-400. *Biochem. Eng. J., YABEC 2001* 11, 189–196. doi:10.1016/S1369-703X(02)00024-4
- Casal, M., Cardoso, H., Leão, C., 1996. Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Read. Engl.* 142 ( Pt 6), 1385–1390. doi:10.1099/13500872-142-6-1385
- Casal, M., Leão, C., 1995. Utilization of short-chain monocarboxylic acids by the yeast *Torulaspora delbrueckii*: Specificity of the transport systems and their regulation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1267, 122–130. doi:10.1016/0167-4889(95)00067-3
- Casal, M., Paiva, S., Andrade, R.P., Gancedo, C., Leão, C., 1999. The Lactate-Proton Symport of *Saccharomyces cerevisiae* Is Encoded by JEN1. *J. Bacteriol.* 181, 2620–2623.
- Casal, M., Paiva, S., Queirós, O., Soares-Silva, I., 2008. Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 974–994. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00128.x
- Cássio, F., Leão, C., Uden, N. van, 1987. Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 509–513.
- Castellanos Estupiñán, J.E., Espinosa Pedraja, R.O., Zamora Baez, A., 2004. Estimación de las propiedades relacionadas con el comportamiento energético de la biomasa. *EcoSolar* 10.
- Čertík, M., Adamechová, Z., Guothová, L., 2013. Simultaneous enrichment of cereals with polyunsaturated fatty acids and pigments by fungal solid state fermentations. *J. Biotechnol.* 168, 130–134. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.03.016
- Certik, M., Shimizu, S., 1999. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 1–14.
- Cescut, J., Fillaudeau, L., Molina-Jouve, C., Uribelarrea, J.-L., 2014. Carbon accumulation in *Rhodotorula glutinis* induced by nitrogen limitation. *Biotechnol. Biofuels* 7, 164. doi:10.1186/s13068-014-0164-0
- Cescut, J., Severac, E., Molina-Jouve, C., Uribelarrea, J.-L., 2011. Optimizing pressurized liquid extraction of microbial lipids using the response surface method. *J. Chromatogr. A* 1218, 373–379. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.003
- Chang, C.L., Seo, T., Matsuzaki, M., Worgall, T.S., Deckelbaum, R.J., 2009. n-3 fatty acids reduce arterial LDL-cholesterol delivery and arterial lipoprotein lipase levels and lipase distribution. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 555–561. doi:10.1161/ATVBAHA.108.182287
- Chang, Y.-H., Chang, K.-S., Hsu, C.-L., Chuang, L.-T., Chen, C.-Y., Huang, F.-Y., Jang, H.-D., 2013. A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose-based media and corn cob hydrolysate for microbial oil production. *Fuel* 105, 711–717. doi:10.1016/j.fuel.2012.10.033
- Chatzifragkou, A., Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G., Papanikolaou, S., 2010. Commercial sugars as substrates for lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 1048–1057. doi:10.1002/ejlt.201000027

- Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., Mystrioti, P., Onjaro, G., Aggelis, G., Papanikolaou, S., 2011. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy* 36, 1097–1108. doi:10.1016/j.energy.2010.11.040
- Cheirsilp, B., Louhasakul, Y., 2013. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. *Bioresour. Technol.* 142, 329–337. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.012
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresour. Technol.* 102, 71–81. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.159
- Cheng, M.H., Walker, T.H., Hulbert, G.J., Raman, D.R., 1999. Fungal production of eicosapentaenoic and arachidonic acids from industrial waste streams and crude soybean oil. *Bioresour. Technol.* 67, 101–110. doi:10.1016/S0960-8524(98)00113-8
- Cheng, Y., Zhou, W., Gao, C., Lan, K., Gao, Y., Wu, Q., 2009. Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 777–781. doi:10.1002/jctb.2111
- Chen, H.-C., Liu, T.-M., 1997. Inoculum effects on the production of  $\gamma$ -linolenic acid by the shake culture of *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Enzyme Microb. Technol.* 21, 137–142. doi:10.1016/S0141-0229(96)00262-1
- Chen, J., Liu, X., Wei, D., Chen, G., 2015. High yields of fatty acid and neutral lipid production from cassava bagasse hydrolysate (CBH) by heterotrophic *Chlorella protothecoides*. *Bioresour. Technol.* 191, 281–290. doi:10.1016/j.biortech.2015.04.116
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2009. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *J. Microbiol. Methods* 77, 41–47. doi:10.1016/j.mimet.2009.01.001
- Chen, X.-F., Huang, C., Yang, X.-Y., Xiong, L., Chen, X.-D., Ma, L.-L., 2013. Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corn cob acid hydrolysate. *Bioresour. Technol.* 143, 18–24. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.102
- Chen, X., Huang, C., Xiong, L., Chen, X., Chen, Y., Ma, L., 2012. Oil production on wastewaters after butanol fermentation by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*. *Bioresour. Technol.* 118, 594–597. doi:10.1016/j.biortech.2012.05.023
- Chen, Y.-H., Walker, T.H., 2011. Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. *Biotechnol. Lett.* 33, 1973–1983. doi:10.1007/s10529-011-0672-y
- Cherubini, F., 2010. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Convers. Manag.* 51, 1412–1421. doi:10.1016/j.enconman.2010.01.015
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Chi, Z., Zheng, Y., Ma, J., Chen, S., 2011. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* culture with dark fermentation hydrogen production effluent as feedstock for microbial lipid production. *Int. J. Hydrog. Energy, European Fuel Cell* 2009 36, 9542–9550. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.04.124
- Cho, H.P., Nakamura, M.T., Clarke, S.D., 1999. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase. *J. Biol. Chem.* 274, 471–477.
- Choi, J.-H., Fukushi, K., Yamamoto, K., 2008. A study on the removal of organic acids from wastewaters using nanofiltration membranes. *Sep. Purif. Technol.* 59, 17–25. doi:10.1016/j.seppur.2007.05.021
- Choi, S.Y., Ryu, D.D.Y., Rhee, J.S., 1982. Production of microbial lipid: Effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 1165–1172. doi:10.1002/bit.260240513

- Christophe, G., Deo, J.L., Kumar, V., Nouaille, R., Fontanille, P., Larroche, C., 2012. Production of oils from acetic acid by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 1270–1279. doi:10.1007/s12010-011-9507-5
- Christophe, G., Kumar, V., Nouaille, R., Gaudet, G., Fontanille, P., Pandey, A., Soccol, C.R., Larroche, C., 2012. Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food? *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132012000100004
- Cot, M., Loret, M.-O., François, J., Benbadis, L., 2007. Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *FEMS Yeast Res.* 7, 22–32. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00152.x
- Cui, Y.Q., van der Lans, R.G., Luyben, K.C., 1997. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 715–726. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19970905)55:5<715::AID-BIT2>3.0.CO;2-E
- Dakrim-Lamari, F., Malbrunot, P., 2013. Combustible hydrogène. *Tech. Ing.*
- Datta, R., Glassner, D.A., Jain, M.K., Vick Roy, J.R., 1992. Fermentation and purification process for succinic acid. US5168055 A.
- Datta, R., Henry, M., 2006. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies — a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81, 1119–1129. doi:10.1002/jctb.1486
- Davis, R., Aden, A., Pienkos, P.T., 2011. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. *Appl. Energy*, Special Issue of Energy from algae: Current status and future trends 88, 3524–3531. doi:10.1016/j.apenergy.2011.04.018
- Dejoye Tanzi, C., Abert Vian, M., Chemat, F., 2013. New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: a green clean and scalable process. *Bioresour. Technol.* 134, 271–275. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.168
- Demirbas, A., 2008. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Convers. Manag.* 49, 2106–2116. doi:10.1016/j.enconman.2008.02.020
- Demirbas, A., 2006. Biodiesel production via non-catalytic SCF method and biodiesel fuel characteristics. *Energy Convers. Manag.* 47, 2271–2282. doi:10.1016/j.enconman.2005.11.019
- Demir, M., Turhan, I., Kucukcetin, A., AlpKent, Z., 2013. Oil production by *Mortierella isabellina* from whey treated with lactase. *Bioresour. Technol.* 128, 365–369. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.078
- de Swaaf, M.E., de Rijk, T.C., Eggink, G., Sijtsma, L., 1999. Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *J. Biotechnol., Biotechnological Aspects of Marine Sponges* 70, 185–192. doi:10.1016/S0168-1656(99)00071-1
- de Swaaf, M.E., Pronk, J.T., Sijtsma, L., 2003. Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 40–43. doi:10.1007/s00253-002-1118-1
- Dey, P., Banerjee, J., Maiti, M.K., 2011. Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates-- *Colletotrichum* sp. and *Alternaria* sp. having potential utilities as biodiesel feedstock. *Bioresour. Technol.* 102, 5815–5823. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.064
- Dick, M.W., 2001. *Straminipolous fungi: Systematics of the Peronosporomycetes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C., Schorr-Galindo, S., 2012. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr. Polym.* 87, 951–962. doi:10.1016/j.carbpol.2011.08.083
- Duarte, S.H., Ansolin, M., Maugeri, F., 2014. Cultivation of *Candida* sp. LEB-M3 in glycerol: Lipid accumulation and prediction of biodiesel quality parameters. *Bioresour. Technol.* 161, 416–422. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.096
- Dyal, S.D., Bouzidi, L., Narine, S.S., 2005. Maximizing the production of  $\gamma$ -linolenic acid in *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana* as a function of pH, temperature and carbon source, nitrogen

- source, metal ions and oil supplementation. *Food Res. Int.* 38, 815–829.  
doi:10.1016/j.foodres.2005.04.002
- Elefsiniotis, P., Wareham, D.G., 2007. Utilization patterns of volatile fatty acids in the denitrification reaction. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 92–97. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.12.006
- El Menyawi, I., Wögerbauer, M., Sigmund, H., Burgmann, H., Graninger, W., 2000. Identification of yeast species by fatty acid profiling as measured by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 742, 13–24. doi:10.1016/S0378-4347(00)00044-X
- Espinosa-Gonzalez, I., Parashar, A., Chae, M., Bressler, D.C., 2014. Cultivation of oleaginous yeast using aqueous fractions derived from hydrothermal pretreatments of biomass. *Bioresour. Technol.* 170, 413–420. doi:10.1016/j.biortech.2014.08.006
- Evans, C.T., Ratledge, C., 1983. A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. *Lipids* 18, 623–629.  
doi:10.1007/BF02534673
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Batsos, A., Galiotou-Panayotou, M., Mallouchos, A., Aggelis, G., 2009. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass Bioenergy* 33, 573–580.  
doi:10.1016/j.biombioe.2008.09.006
- Fan, X., Burton, R., Zhou, Y., 2010. Glycerol (Byproduct of Biodiesel Production) as a Source for Fuels and Chemicals - Mini Review. 2009-08-26~2010-02-02~2010-04-09~ Open Fuels Energy Sci. J. 3, 17–22. doi:10.2174/1876973X01003010017
- FAO. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation, 2010. FAO Food Nutr. Pap. 91, 1-189.
- Farges, B., Poughon, L., Pons, A., Dussap, C.-G., 2012. Methodology for Bioprocess Analysis: Mass Balances, Yields and Stoichiometries, in: Innocenti, A. (Ed.), *Stoichiometry and Research - The Importance of Quantity in Biomedicine*. InTech.
- Fei, Q., Chang, H.N., Shang, L., Choi, J., 2011a. Exploring low-cost carbon sources for microbial lipids production by fed-batch cultivation of *Cryptococcus albidus*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16, 482–487. doi:10.1007/s12257-010-0370-y
- Fei, Q., Chang, H.N., Shang, L., Choi, J., Kim, N., Kang, J., 2011b. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 102, 2695–2701. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.141
- Feofilova, E.P., Sergeeva, I.E., Ivashchkin, A.A., 2010. [Biodiesel-fuel: content, production, producers, contemporary biotechnology (review)]. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 46, 405–415.
- Fischer, C.R., Klein-Marcuschamer, D., Stephanopoulos, G., 2008. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metab. Eng.* 10, 295–304.  
doi:10.1016/j.ymben.2008.06.009
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fontanille, P., Kumar, V., Christophe, G., Nouaille, R., Larroche, C., 2012. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* 114, 443–449. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.091
- Fröhlich, A., Rice, B., 2005. Evaluation of *Camelina sativa* oil as a feedstock for biodiesel production. *Ind. Crops Prod.* 21, 25–31. doi:10.1016/j.indcrop.2003.12.004
- Gálvez, S., Gadal, P., 1995. On the function of the NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isoenzymes in living organisms. *Plant Sci.* 105, 1–14. doi:10.1016/0168-9452(94)04041-E
- Gao, D., Zeng, J., Zheng, Y., Yu, X., Chen, S., 2013. Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. *Bioresour. Technol.* 133, 315–321. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.132
- Gaudet, G., Forano, E., Dauphin, G., Delort, A.M., 1992. Futile cycling of glycogen in *Fibrobacter succinogenes* as shown by in situ <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR investigation. *Eur. J. Biochem. FEBS* 207, 155–162.

- Geitmann, S., 2007. Énergies renouvelables & carburants alternatifs: de nouvelles énergies pour l'avenir. Hydrogeit Verlag.
- Gen, Q., Wang, Q., Chi, Z.-M., 2014. Direct conversion of cassava starch into single cell oil by co-cultures of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and immobilized amylases-producing yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. *Renew. Energy* 62, 522–526. doi:10.1016/j.renene.2013.08.016
- Gessner, M.O.; Neumann, P.T.M., 2005. Total lipids. In: Graça MAS, Bärlocher F, Gessner MO. editors. *Methods to study litter decomposition: A practical guide*, Berlin: Springer, 91-96.
- Ghaly, A.E., Dave, D., Brooks, M.S., Budge, S., 2010. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 6, 54–76.
- Ghasemnezhad, A., Honermeier, B., 2008. Yield, oil constituents, and protein content of evening primrose (*Oenothera biennis* L.) seeds depending on harvest time, harvest method and nitrogen application. *Ind. Crops Prod.* 28, 17–23. doi:10.1016/j.indcrop.2007.12.006
- Gill, C.O., Hall, M.J., Ratledge, C., 1977. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 231–239.
- Gladyshev, M.I., Sushchik, N.N., Makhutova, O.N., 2013. Production of EPA and DHA in aquatic ecosystems and their transfer to the land. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 107, 117–126. doi:10.1016/j.prostaglandins.2013.03.002
- Gong, Z., Shen, H., Yang, X., Wang, Q., Xie, H., Zhao, Z.K., 2014. Lipid production from corn stover by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biotechnol. Biofuels* 7, 158. doi:10.1186/s13068-014-0158-y
- Gong, Z., Wang, Q., Shen, H., Hu, C., Jin, G., Zhao, Z.K., 2012. Co-fermentation of cellobiose and xylose by *Lipomyces starkeyi* for lipid production. *Bioresour. Technol.* 117, 20–24. doi:10.1016/j.biortech.2012.04.063
- Govender, T., Ramanna, L., Rawat, I., Bux, F., 2012. BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. *Bioresour. Technol.* 114, 507–511. doi:10.1016/j.biortech.2012.03.024
- Gupta, A., Barrow, C.J., Puri, M., 2012. Omega-3 biotechnology: Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. *Biotechnol. Adv.* 30, 1733–1745. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.02.014
- Haas, M.J., McAloon, A.J., Yee, W.C., Foglia, T.A., 2006. A process model to estimate biodiesel production costs. *Bioresour. Technol.* 97, 671–678. doi:10.1016/j.biortech.2005.03.039
- Hall, M.J., Ratledge, C., 1977. Lipid Accumulation in an Oleaginous Yeast (*Candida* 107) Growing on Glucose Under Various Conditions in a One- and Two-Stage Continuous Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 577–584.
- Hansson, L., Dostálek, M., 1986. Effect of culture conditions on fatty acid composition in lipids produced by the yeast *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63, 1179–1184. doi:10.1007/BF02663947
- Hartmanis, M.G.N., Klason, T., Gatenbeck, S., 1984. Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20, 66–71. doi:10.1007/BF00254648
- Hassan, M., Blanc, P.J., Granger, L.-M., Pareilleux, A., Goma, G., 1996. Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. *Process Biochem.* 31, 355–361. doi:10.1016/0032-9592(95)00077-1
- Hassan, M., Blanc, P.J., Granger, L.-M., Pareilleux, A., Goma, G., 1993. Lipid production by an unsaturated fatty acid auxotroph of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* grown in single-stage continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 483–488. doi:10.1007/BF00175735
- Higashiyama, K., Yaguchi, T., Akimoto, K., Fujikawaa, S., Shimizu, S., 1998. Effects of mineral addition on the growth morphology of and arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 1815–1819. doi:10.1007/s11746-998-0336-9

- Hilgsmann, S., Masset, J., Hamilton, C., Beckers, L., Thonart, P., 2011. Comparative study of biological hydrogen production by pure strains and consortia of facultative and strict anaerobic bacteria. *Bioresour. Technol.* 102, 3810–3818. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.094
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., Tiffany, D., 2006. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 11206–11210. doi:10.1073/pnas.0604600103
- Hniman, A., Prasertsan, P., O-Thong, S., 2011. Community analysis of thermophilic hydrogen-producing consortia enriched from Thailand hot spring with mixed xylose and glucose. *Int. J. Hydrog. Energy*, 2010 Asian/APEC BioH<sub>2</sub> 36, 14217–14226. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.05.087
- Horrobin, D.F., 1992. Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Prog. Lipid Res.* 31, 163–194.
- Ho, S.-H., Chen, C.-Y., Chang, J.-S., 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour. Technol.*, Special issue on the Challenges in Environmental Science and Engineering 113, 244–252. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.133
- Huang, C., Chen, X., Xiong, L., Yang, X., Chen, X., Ma, L., Chen, Y., 2013. Microbial oil production from corn cob acid hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*. *Biomass Bioenergy* 49, 273–278. doi:10.1016/j.biombioe.2012.12.023
- Huang, C., Wu, H., Liu, Z., Cai, J., Lou, W., Zong, M., 2012. Effect of organic acids on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Trichosporon fermentans*. *Biotechnol. Biofuels* 5, 4. doi:10.1186/1754-6834-5-4
- Huang, G.-H., Chen, G., Chen, F., 2009. Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence. *Biomass Bioenergy* 33, 1386–1392. doi:10.1016/j.biombioe.2009.05.022
- Huang, T.Y., Lu, W.C., Chu, I.M., 2012. A fermentation strategy for producing docosahexaenoic acid in *Aurantiochytrium limacinum* SR21 and increasing C22:6 proportions in total fatty acid. *Bioresour. Technol.* 123, 8–14. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.068
- Huerlimann, R., de Nys, R., Heimann, K., 2010. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnol. Bioeng.* 107, 245–257. doi:10.1002/bit.22809
- Iida, I., Nakahara, T., Yokochi, T., Kamisaka, Y., Yagi, H., Yamaoka, M., Suzuki, O., 1996. Improvement of docosahexaenoic acid production in a culture of *Thraustochytrium aureum* by medium optimization. *J. Ferment. Bioeng.* 81, 76–78. doi:10.1016/0922-338X(96)83125-4
- Infantes, D., González del Campo, A., Villaseñor, J., Fernández, F.J., 2011. Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. *Int. J. Hydrog. Energy* 36, 15595–15601. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.09.061
- Jang, H.-D., Yang, S.-S., 2008. Polyunsaturated fatty acids production with a solid-state column reactor. *Bioresour. Technol.* 99, 6181–6189. doi:10.1016/j.biortech.2007.12.024
- Jiang, Y., Chen, F., Liang, S.-Z., 1999. Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *Process Biochem.* 34, 633–637. doi:10.1016/S0032-9592(98)00134-4
- Johnson, M.B., Wen, Z., 2009. Production of Biodiesel Fuel from the Microalga *Schizochytrium limacinum* by Direct Transesterification of Algal Biomass. *Energy Fuels* 23, 5179–5183. doi:10.1021/ef900704h
- Juang, R.-S., Huang, R.-H., Wu, R.-T., 1997. Separation of citric and lactic acids in aqueous solutions by solvent extraction and liquid membrane processes. *J. Membr. Sci.* 136, 89–99. doi:10.1016/S0376-7388(97)00176-2
- Kahveci, D., Xu, X., 2011. Repeated hydrolysis process is effective for enrichment of omega 3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. *Food Chem.* 129, 1552–1558. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.142



- Kamat, S., Khot, M., Zinjarde, S., RaviKumar, A., Gade, W.N., 2013. Coupled production of single cell oil as biodiesel feedstock, xylitol and xylanase from sugarcane bagasse in a biorefinery concept using fungi from the tropical mangrove wetlands. *Bioresour. Technol.* 135, 246–253. doi:10.1016/j.biortech.2012.11.059
- Karadag, D., 2011. Anaerobic H<sub>2</sub> production at elevated temperature (60 °C) by enriched mixed consortia from mesophilic sources. *Int. J. Hydrog. Energy*, 11th International Conference: “Hydrogen Materials Science & Chemistry of Carbon Nanomaterials” 36, 458–465. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.10.003
- Kavadia, A., Komaitis, M., Chevalot, I., Blanchard, F., Marc, I., Aggelis, G., 2001. Lipid and  $\gamma$ -linolenic acid accumulation in strains of zygomycetes growing on glucose. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78, 341–346. doi:10.1007/s11746-001-0266-3
- Kavšček, M., Bhutada, G., Madl, T., Natter, K., 2015. Optimization of lipid production with a genome-scale model of *Yarrowia lipolytica*. *BMC Syst. Biol.* 9, 72. doi:10.1186/s12918-015-0217-4
- Kendrick, A., Ratledge, C., 1992. Lipid formation in the oleaginous mould *Entomophthora exitalis* grown in continuous culture: effects of growth rate, temperature and dissolved oxygen tension on polyunsaturated fatty acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 18–22. doi:10.1007/BF00174196
- Kertes, A.S., King, C.J., 1986. Extraction chemistry of fermentation product carboxylic acids. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 269–282. doi:10.1002/bit.260280217
- Kim, Y.-H., Choi, Y.-K., Park, J., Lee, S., Yang, Y.-H., Kim, H.J., Park, T.-J., Hwan Kim, Y., Lee, S.H., 2012. Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass. *Bioresour. Technol.*, Special Issue: Innovative Researches on Algal Biomass 109, 312–315. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.064
- Knothe, G., 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process. Technol.*, Biodiesel Processing and Production 86, 1059–1070. doi:10.1016/j.fuproc.2004.11.002
- Knothe, G., Steidley, K.R., 2005. Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. *Fuel* 84, 1059–1065. doi:10.1016/j.fuel.2005.01.016
- Kohli, P., Levy, B.D., 2009. Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 158, 960–971. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00290.x
- Koutinas, A.A., Chatzifragkou, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., Kookos, I.K., 2014. Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel* 116, 566–577. doi:10.1016/j.fuel.2013.08.045
- Kyle, D.J., 1994. Microbial oil mixtures and uses thereof. US5374657.
- Lapuerta, M., Rodríguez-Fernández, J., Armas, O., 2010. Correlation for the estimation of the density of fatty acid esters fuels and its implications. A proposed Biodiesel Cetane Index. *Chem. Phys. Lipids* 163, 720–727. doi:10.1016/j.chemphyslip.2010.06.004
- La Rovere, E.L., Pereira, A.S., Simões, A.F., 2011. Biofuels and Sustainable Energy Development in Brazil. *World Dev.* 39, 1026–1036.
- Latrille, E., Trably, E., Larroche, C., 2011. Production de biohydrogène : voie fermentaire sombre | Techniques de l'Ingénieur. *Tech. Ing.* BIO3351, 1–19.
- Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y., Oh, H.-M., 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour. Technol.*, Supplement Issue on Recent Developments of Biomass Conversion Technologies 101, S75–S77. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.058
- Lee, S.J., Yoon, B.-D., Oh, H.-M., 1998. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Tech.* 12, 553–556. doi:10.1023/A:1008811716448
- Lee, S., Son, H., Lee, J., Min, K., Choi, G.J., Kim, J.-C., Lee, Y.-W., 2011. Functional analyses of two acetyl coenzyme A synthetases in the ascomycete *Gibberella zeae*. *Eukaryot. Cell* 10, 1043–1052. doi:10.1128/EC.05071-11

- Levin, D.B., Zhu, H., Beland, M., Cicek, N., Holbein, B.E., 2007. Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada. *Bioresour. Technol.* 98, 654–660. doi:10.1016/j.biortech.2006.02.027
- Liang, Y., Zhao, X., Strait, M., Wen, Z., 2012. Use of dry-milling derived thin stillage for producing eicosapentaenoic acid (EPA) by the fungus *Pythium irregulare*. *Bioresour. Technol.* 111, 404–409. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.035
- Lian, J., Garcia-Perez, M., Chen, S., 2013. Fermentation of levoglucosan with oleaginous yeasts for lipid production. *Bioresour. Technol.* 133, 183–189. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.031
- Ling, J., Nip, S., Shim, H., 2013. Enhancement of lipid productivity of *Rhodospiridium toruloides* in distillery wastewater by increasing cell density. *Bioresour. Technol.* 146, 301–309. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.023
- Liu, B., Zhao, Z. (Kent), 2007. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 775–780. doi:10.1002/jctb.1744
- Liu, D., Liu, D., Zeng, R.J., Angelidaki, I., 2006. Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. *Water Res.* 40, 2230–2236. doi:10.1016/j.watres.2006.03.029
- Liu, Z.-Y., Wang, G.-C., Zhou, B.-C., 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.*, Exploring Horizons in Biotechnology: A Global Venture 99, 4717–4722. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.073
- Li, Y., Zhao, Z. (Kent), Bai, F., 2007. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 312–317. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.02.008
- Lomakin, I.B., Xiong, Y., Steitz, T.A., 2007. The crystal structure of yeast fatty acid synthase, a cellular machine with eight active sites working together. *Cell* 129, 319–332. doi:10.1016/j.cell.2007.03.013
- López-Martínez, J.C., Campra-Madrid, P., Guil-Guerrero, J.L., 2004.  $\gamma$ -Linolenic acid enrichment from *Borago officinalis* and *Echium fastuosum* seed oils and fatty acids by low temperature crystallization. *J. Biosci. Bioeng.* 97, 294–298. doi:10.1016/S1389-1723(04)70208-X
- Lo, Y.-C., Chen, W.-M., Hung, C.-H., Chen, S.-D., Chang, J.-S., 2008. Dark H<sub>2</sub> fermentation from sucrose and xylose using H<sub>2</sub>-producing indigenous bacteria: Feasibility and kinetic studies. *Water Res.* 42, 827–842. doi:10.1016/j.watres.2007.08.023
- Lusk, J.E., Williams, R.J.P., Kennedy, E.P., 1968. Magnesium and the Growth of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 243, 2618–2624.
- Makri, A., Fakas, S., Aggelis, G., 2010. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresour. Technol.* 101, 2351–2358. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.024
- Manivannan, K., Anantharaman, P., Balasubramanian, T., 2012. Evaluation of antioxidant properties of marine microalga *Chlorella marina* (Butcher, 1952). *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, S342–S346. doi:10.1016/S2221-1691(12)60185-3
- Marcati, A., Ursu, A.V., Laroche, C., Soanen, N., Marchal, L., Jubeau, S., Djelveh, G., Michaud, P., 2014. Extraction and fractionation of polysaccharides and B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by membrane technology. *Algal Res.* 5, 258–263. doi:10.1016/j.algal.2014.03.006
- Matsakas, L., Bonturi, N., Miranda, E.A., Rova, U., Christakopoulos, P., 2015. High concentrations of dried sorghum stalks as a biomass feedstock for single cell oil production by *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnol. Biofuels* 8, 6. doi:10.1186/s13068-014-0190-y
- Matsakas, L., Sterioti, A.-A., Rova, U., Christakopoulos, P., 2014. Use of dried sweet sorghum for the efficient production of lipids by the yeast *Lipomyces starkeyi* CBS 1807. *Ind. Crops Prod.* 62, 367–372. doi:10.1016/j.indcrop.2014.09.011
- Mba, O.I., Dumont, M.-J., Ngadi, M., 2015. Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry – A review. *Food Biosci.* 10, 26–41. doi:10.1016/j.fbio.2015.01.003

- McNeill, J., Turland, N.J., Monro, A.M., Lepschi, B.J., 2011. XVIII International Botanical Congress: Preliminary mail vote and report of Congress action on nomenclature proposals. *Taxon* 60, 1507–1520.
- Meesters, P. a. E.P., Huijberts, G.N.M., Eggink, G., 1996. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 575–579. doi:10.1007/s002530050731
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M., 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew. Energy* 34, 1–5. doi:10.1016/j.renene.2008.04.014
- Metz, J.G., Kuner, J., Rosenzweig, B., Lippmeier, J.C., Roessler, P., Zirkle, R., 2009. Biochemical characterization of polyunsaturated fatty acid synthesis in *Schizochytrium*: Release of the products as free fatty acids. *Plant Physiol. Biochem., Plant Lipids* 47, 472–478. doi:10.1016/j.plaphy.2009.02.002
- Metz, J.G., Roessler, P., Facciotti, D., Levering, C., Dittrich, F., Lassner, M., Valentine, R., Lardizabal, K., Domergue, F., Yamada, A., Yazawa, K., Knauf, V., Browse, J., 2001. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science* 293, 290–293. doi:10.1126/science.1059593
- Mitra, D., Rasmussen, M.L., Chand, P., Chintareddy, V.R., Yao, L., Grewell, D., Verkade, J.G., Wang, T., van Leeuwen, J.H., 2012. Value-added oil and animal feed production from corn-ethanol stillage using the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Bioresour. Technol.* 107, 368–375. doi:10.1016/j.biortech.2011.12.031
- Mohibbe Azam, M., Waris, A., Nahar, N.M., 2005. Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. *Biomass Bioenergy* 29, 293–302. doi:10.1016/j.biombioe.2005.05.001
- Mollapour, M., Piper, P.W., 2007. Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation Targets the Yeast Fps1 Aquaglyceroporin for Endocytosis, Thereby Rendering Cells Resistant to Acetic Acid. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6446–6456. doi:10.1128/MCB.02205-06
- Monsigny, M., Petit, C., Roche, A.C., 1988. Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Anal. Biochem.* 175, 525–530.
- Morales-Sánchez, D., Tinoco-Valencia, R., Caro-Bermúdez, M.A., Martínez, A., 2014. Culturing *Neochloris oleoabundans* microalga in a nitrogen-limited, heterotrophic fed-batch system to enhance lipid and carbohydrate accumulation. *Algal Res.* 5, 61–69. doi:10.1016/j.algal.2014.05.006
- Morrison, W.R., Smith, L.M., 1964. PREPARATION OF FATTY ACID METHYL ESTERS AND DIMETHYLACETALS FROM LIPIDS WITH BORON FLUORIDE--METHANOL. *J. Lipid Res.* 5, 600–608.
- Moser, B.R., 2009. Biodiesel production, properties, and feedstocks. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 45, 229–266. doi:10.1007/s11627-009-9204-z
- Munch, G., Sestric, R., Sparling, R., Levin, D.B., Cicek, N., 2015. Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodospiridium babjevae* and *Rhodospiridium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol. *Bioresour. Technol.* 185, 49–55. doi:10.1016/j.biortech.2015.02.051
- Muniraj, I.K., Xiao, L., Hu, Z., Zhan, X., Shi, J., 2013. Microbial lipid production from potato processing wastewater using oleaginous filamentous fungi *Aspergillus oryzae*. *Water Res.* 47, 3477–3483. doi:10.1016/j.watres.2013.03.046
- Muniyappa, P.R., Brammer, S.C., Nouredini, H., 1996. Improved conversion of plant oils and animal fats into biodiesel and co-product. *Bioresour. Technol., A Collection of Papers Presented at An Alternative Energy Conference - Liquid Fuels, Lubricants and Additives from Biomass* 56, 19–24. doi:10.1016/0960-8524(95)00178-6
- Muñoz-Elías, E.J., McKinney, J.D., 2006. Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cell. Microbiol.* 8, 10–22. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00648.x

- Muñoz-Elías, E.J., Upton, A.M., Cherian, J., McKinney, J.D., 2006. Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. *Mol. Microbiol.* 60, 1109–1122. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05155.x
- Nigam, P.S., Singh, A., 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energy Combust. Sci.* 37, 52–68. doi:10.1016/j.pecs.2010.01.003
- Nigam, P., 2000. Production of oils and fatty acids. In: Robinson CA Batt PD editors. *Encyclopedia of Food Microbiology* 2, 18–729.
- Nisha, A., Udaya Sankar, K., Venkateswaran, G., 2012. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Mortierella alpina* single cell oil: Comparison with organic solvent extraction. *Food Chem.* 133, 220–226. doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.081
- Ochoa-Estopier, A., Guillouet, S.E., 2014. D-stat culture for studying the metabolic shifts from oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*. *J. Biotechnol.* 170, 35–41. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.11.008
- Ortigueira, J., Alves, L., Gouveia, L., Moura, P., 2015. Third generation biohydrogen production by *Clostridium butyricum* and adapted mixed cultures from *Scenedesmus obliquus* microalga biomass. *Fuel* 153, 128–134. doi:10.1016/j.fuel.2015.02.093
- Pace, C.N., Laurents, D.V., Thomson, J.A., 1990. pH dependence of the urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease A and ribonuclease T1. *Biochemistry (Mosc.)* 29, 2564–2572. doi:10.1021/bi00462a019
- Paiva, S., Devaux, F., Barbosa, S., Jacq, C., Casal, M., 2004. Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* 21, 201–210. doi:10.1002/yea.1056
- Papanikolaou, S., Aggelis, G., 2002. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour. Technol.* 82, 43–49. doi:10.1016/S0960-8524(01)00149-3
- Papanikolaou, S., Diamantopoulou, P., Chatzifragkou, A., Philippoussis, A., Aggelis, G., 2010. Suitability of Low-Cost Sugars as Substrates for Lipid Production by the Fungus *Thamnidium elegans*. *Energy Fuels* 24, 4078–4086. doi:10.1021/ef1004804
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., Aggelis, G., 2007. Lipid production by oleaginous *Mucorales* cultivated on renewable carbon sources. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 1060–1070. doi:10.1002/ejlt.200700169
- Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G., 2004. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresour. Technol.* 95, 287–291. doi:10.1016/j.biortech.2004.02.016
- Patel, A., Pruthi, V., Singh, R.P., Pruthi, P.A., 2015. Synergistic effect of fermentable and non-fermentable carbon sources enhances TAG accumulation in oleaginous yeast *Rhodospiridium kratochvilovae* HIMPA1. *Bioresour. Technol.*, International Conference on Emerging Trends in Biotechnology 188, 136–144. doi:10.1016/j.biortech.2015.02.062
- Patton, C.J., Crouch, S.R., 1977. Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Anal. Chem.* 49, 464–469. doi:10.1021/ac50011a034
- Peng, W., Huang, C., Chen, X., Xiong, L., Chen, X., Chen, Y., Ma, L., 2013. Microbial conversion of wastewater from butanol fermentation to microbial oil by oleaginous yeast *Trichosporon dermatis*. *Renew. Energy* 55, 31–34. doi:10.1016/j.renene.2012.12.017
- Peng, X., Chen, H., 2008. Rapid estimation of single cell oil content of solid-state fermented mass using near-infrared spectroscopy. *Bioresour. Technol.* 99, 8869–8872. doi:10.1016/j.biortech.2008.04.055
- Peralta-Yahya, P.P., Keasling, J.D., 2010. Advanced biofuel production in microbes. *Biotechnol. J.* 5, 147–162. doi:10.1002/biot.200900220

- Pereyra-Irujo, G.A., Izquierdo, N.G., Covi, M., Nolasco, S.M., Quiroz, F., Aguirrezábal, L.A.N., 2009. Variability in sunflower oil quality for biodiesel production: A simulation study. *Biomass Bioenergy* 33, 459–468. doi:10.1016/j.biombioe.2008.07.007
- Pessiot, J., Nouaille, R., Jobard, M., Singhania, R.R., Bournilhas, A., Christophe, G., Fontanille, P., Peyret, P., Fonty, G., Larroche, C., 2012. Fed-batch anaerobic valorization of slaughterhouse by-products with mesophilic microbial consortia without methane production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 1728–1743. doi:10.1007/s12010-011-9516-4
- Piper, P., Calderon, C.O., Hatzixanthis, K., Mollapour, M., 2001. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiol. Read. Engl.* 147, 2635–2642. doi:10.1099/00221287-147-10-2635
- Piper, P.W., 1999. Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1219–1227. doi:10.1016/S0891-5849(99)00147-1
- Poughon, L., Duchez, D., Cornet, J.F., Dussap, C.G., 2003. KLa determination: comparative study for a gas mass balance method. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 25, 341–348. doi:10.1007/s00449-003-0321-5
- Pramanik, K., 2003. Properties and use of jatropha curcas oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. *Renew. Energy* 28, 239–248. doi:10.1016/S0960-1481(02)00027-7
- Pronk, J.T., van der Linden-Beuman, A., Verduyn, C., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P., 1994. Propionate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for the metabolon hypothesis. *Microbiology* 140, 717–722. doi:10.1099/00221287-140-4-717
- Qiu, X., 2003. Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7,10,13,16,19): two distinct pathways. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 68, 181–186.
- Rakicka, M., Lazar, Z., Dulermo, T., Fickers, P., Nicaud, J.M., 2015. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. *Biotechnol. Biofuels* 8, 104. doi:10.1186/s13068-015-0286-z
- Ramos, M.J., Fernández, C.M., Casas, A., Rodríguez, L., Pérez, A., 2009. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour. Technol.* 100, 261–268. doi:10.1016/j.biortech.2008.06.039
- Ratlledge, C., 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie, Recent advances in lipid metabolism and related disorders* 86, 807–815. doi:10.1016/j.biochi.2004.09.017
- Ratlledge, C., 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 1047–1050. doi:10.1042/
- Ratlledge, C., 1994. Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids, in: Kamel, B.S., Kakuda, Y. (Eds.), *Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids*. Springer US, pp. 235–291.
- Ratlledge, C., 1993. Single cell oils--have they a biotechnological future? *Trends Biotechnol.* 11, 278–284. doi:10.1016/0167-7799(93)90015-2
- Ratlledge, C., Cohen, Z., 2008. Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils ? *Lipid Technol.* 20, 155–160.
- Ratlledge, C., Wynn, J.P., 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 51, 1–51.
- Ratnay, J.B., Schibeci, A., Kidby, D.K., 1975. Lipids of yeasts. *Bacteriol. Rev.* 39, 197–231.
- Ren, H.-Y., Liu, B.-F., Kong, F., Zhao, L., Xing, D., Ren, N.-Q., 2014. Enhanced energy conversion efficiency from high strength synthetic organic wastewater by sequential dark fermentative hydrogen production and algal lipid accumulation. *Bioresour. Technol.* 157, 355–359. doi:10.1016/j.biortech.2014.02.009
- Richardson, J.W., Johnson, M.D., Outlaw, J.L., 2012. Economic comparison of open pond raceways to photo bio-reactors for profitable production of algae for transportation fuels in the Southwest. *Algal Res.* 1, 93–100. doi:10.1016/j.algal.2012.04.001

- Rodríguez, J., Kleerebezem, R., Lema, J.M., van Loosdrecht, M.C.M., 2006. Modeling product formation in anaerobic mixed culture fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 592–606. doi:10.1002/bit.20765
- Rogers, J.N., Rosenberg, J.N., Guzman, B.J., Oh, V.H., Mimbela, L.E., Ghassemi, A., Betenbaugh, M.J., Oyler, G.A., Donohue, M.D., 2014. A critical analysis of paddlewheel-driven raceway ponds for algal biofuel production at commercial scales. *Algal Res., Progress and Perspectives on Microalgal Mass Culture* 4, 76–88. doi:10.1016/j.algal.2013.11.007
- Ruangsomboon, S., 2015. Effects of different media and nitrogen sources and levels on growth and lipid of green microalga *Botryococcus braunii* KMITL and its biodiesel properties based on fatty acid composition. *Bioresour. Technol.* 191, 377–384. doi:10.1016/j.biortech.2015.01.091
- Ruan, Z., Zanotti, M., Wang, X., Ducey, C., Liu, Y., 2012. Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 110, 198–205. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.053
- Ryu, B.-G., Kim, J., Kim, K., Choi, Y.-E., Han, J.-I., Yang, J.-W., 2013. High-cell-density cultivation of oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biodiesel production using organic waste from the brewery industry. *Bioresour. Technol., Biorefineries* 135, 357–364. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.054
- Sakuradani, E., Ando, A., Shimizu, S., Ogawa, J., 2013. Metabolic engineering for the production of polyunsaturated fatty acids by oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4. *J. Biosci. Bioeng.* 116, 417–422. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.04.008
- Sawaengsak, W., Silalertruksa, T., Bangviwat, A., Gheewala, S.H., 2014. Life cycle cost of biodiesel production from microalgae in Thailand. *Energy Sustain. Dev.* 18, 67–74. doi:10.1016/j.esd.2013.12.003
- Schujman, G.E., de Mendoza, D., 2008. Regulation of type II fatty acid synthase in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 148–152. doi:10.1016/j.mib.2008.02.002
- Sehat, N., Kramer, J.K., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Roach, J.A., Eulitz, K., Morehouse, K.M., Ku, Y., 1998. Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids* 33, 963–971.
- Seo, Y. hwan, Han, S., Han, J.-I., 2014. Economic biodiesel production using algal residue as substrate of lipid producing yeast *Cryptococcus curvatus*. *Renew. Energy* 69, 473–478. doi:10.1016/j.renene.2014.03.062
- Seo, Y. hwan, Lee, I. gyu, Han, J. in, 2013. Cultivation and lipid production of yeast *Cryptococcus curvatus* using pretreated waste active sludge supernatant. *Bioresour. Technol., Biorefineries* 135, 304–308. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.024
- Sharma, Y.C., Singh, B., 2009. Development of biodiesel: Current scenario. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13, 1646–1651. doi:10.1016/j.rser.2008.08.009
- Shen, H., Gong, Z., Yang, X., Jin, G., Bai, F., Zhao, Z.K., 2013. Kinetics of continuous cultivation of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *J. Biotechnol.* 168, 85–89. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.08.010
- Shen, L., Bagley, D.M., Liss, S.N., 2009. Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from continuous stirred tank and membrane bioreactors. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 3689–3696. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.03.006
- Shimada, Y., Sugihara, A., Minamigawa, Y., Higashiyama, K., Akimoto, K., Fujikawa, S., Komemushi, S., Tominaga, Y., 1998. Enzymatic enrichment of arachidonic acid from *Mortierella* single-cell oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 1213–1217. doi:10.1007/s11746-998-0314-2
- Silitonga, A.S., Atabani, A.E., Mahlia, T.M.I., Masjuki, H.H., Badruddin, I.A., Mekhilef, S., 2011. A review on prospect of *Jatropha curcas* for biodiesel in Indonesia. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15, 3733–3756. doi:10.1016/j.rser.2011.07.011

- Simopoulos, A.P., 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* 60, 502–507. doi:10.1016/j.biopha.2006.07.080
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Christophe, G., Fontanille, P., Larroche, C., 2013. Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation. *Bioresour. Technol.*, Special Issue: IBS 2012 & Special Issue: IFIBiop 145, 166–174. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.137
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A., 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, Invited Review Issue 2009 44, 13–18. doi:10.1016/j.bej.2008.10.019
- Siregar, K., Tambunan, A.H., Irwanto, A.K., Wirawan, S.S., Araki, T., 2015. A Comparison of Life Cycle Assessment on Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and Physic Nut (*Jatropha curcas* Linn.) as Feedstock for Biodiesel Production in Indonesia. *Energy Procedia*, Conference and Exhibition Indonesia - New and Renewable Energy and Energy Conservation (The 3rd Indo EBTKE-ConEx 2014) 65, 170–179. doi:10.1016/j.egypro.2015.01.054
- Sousa, M.J., Miranda, L., Côrte-Real, M., Leão, C., 1996. Transport of acetic acid in *Zygosaccharomyces bailii*: effects of ethanol and their implications on the resistance of the yeast to acidic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3152–3157.
- Sousa, M.J., Rodrigues, F., Côrte-Real, M., Leão, C., 1998. Mechanisms underlying the transport and intracellular metabolism of acetic acid in the presence of glucose in the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiol. Read. Engl.* 144 ( Pt 3), 665–670. doi:10.1099/00221287-144-3-665
- Srikanth, S., Venkata Mohan, S., 2014. Regulating feedback inhibition caused by the accumulated acid intermediates during acidogenic hydrogen production through feed replacement. *Int. J. Hydrog. Energy* 39, 10028–10040. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.04.152
- Srikanth, S., Venkata Mohan, S., Prathima Devi, M., Peri, D., Sarma, P.N., 2009. Acetate and butyrate as substrates for hydrogen production through photo-fermentation: Process optimization and combined performance evaluation. *Int. J. Hydrog. Energy*, IWB 2008IWB 2008 34, 7513–7522. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.05.095
- Stredansky, M., Conti, E., Salaris, A., 2000. Production of polyunsaturated fatty acids by *Pythium ultimum* in solid-state cultivation. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 304–307. doi:10.1016/S0141-0229(99)00146-5
- Subramaniam, R., Dufreche, S., Zappi, M., Bajpai, R., 2010. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 1271–1287. doi:10.1007/s10295-010-0884-5
- Sudheendran, S., Chang, C.C., Deckelbaum, R.J., 2010. N-3 vs. saturated fatty acids: effects on the arterial wall. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 82, 205–209. doi:10.1016/j.plefa.2010.02.020
- Sugiyama, M., Sasano, Y., Harashima, S., 2015. Mechanism of Yeast Adaptation to Weak Organic Acid Stress, in: Takagi, H., Kitagaki, H. (Eds.), *Stress Biology of Yeasts and Fungi*. Springer Japan, pp. 107–121.
- Su, H., Cheng, J., Zhou, J., Song, W., Cen, K., 2009. Combination of dark- and photo-fermentation to enhance hydrogen production and energy conversion efficiency. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 8846–8853. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.09.001
- Sydney, E.B., Sturm, W., de Carvalho, J.C., Thomaz-Soccol, V., Larroche, C., Pandey, A., Soccol, C.R., 2010. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresour. Technol.* 101, 5892–5896. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.088
- Tabuchi, T., Satoh, T., 1976. Distinction between Isocitrate Lyase and Methylisocitrate Lyase in *Candida lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.* 40, 1863–1869. doi:10.1080/00021369.1976.10862298
- Takagi, M., Karseno, Yoshida, T., 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 223–226. doi:10.1263/jbb.101.223

- Takeno, S., Sakuradani, E., Tomi, A., Inohara-Ochiai, M., Kawashima, H., Shimizu, S., 2005. Transformation of oil-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, using Zeocin, and application to arachidonic acid production. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 617–622. doi:10.1263/jbb.100.617
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., Zhong, J., 2011. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresour. Technol.* 102, 3071–3076. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.047
- Taylor, B., Xiao, N., Sikorski, J., Yong, M., Harris, T., Helme, T., Smallbone, A., Bhavé, A., Kraft, M., 2013. Techno-economic assessment of carbon-negative algal biodiesel for transport solutions. *Appl. Energy* 106, 262–274. doi:10.1016/j.apenergy.2013.01.065
- Terano, T., Tanaka, T., Tamura, Y., Kitagawa, M., Higashi, H., Saito, Y., Hirai, A., 1999. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibit vascular smooth muscle cell proliferation by inhibiting phosphorylation of Cdk2-cyclinE complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 502–506. doi:10.1006/bbrc.1998.9976
- ter Horst, M., Urbin, S., Burton, R., McMillan, C., 2009. Using proton nuclear magnetic resonance as a rapid response research tool for methyl ester characterization in biodiesel. *Lipid Technol.* 21, 39–41. doi:10.1002/lite.200900004
- Theerarattananoon, K., Xu, F., Wilson, J., Staggenborg, S., McKinney, L., Vadlani, P., Pei, Z., Wang, D., 2011. Effects of the pelleting conditions on chemical composition and sugar yield of corn stover, big bluestem, wheat straw, and sorghum stalk pellets. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35, 615–623. doi:10.1007/s00449-011-0642-8
- Thies, F., Garry, J.M.C., Yaqoob, P., Rerkasem, K., Williams, J., Shearman, C.P., Gallagher, P.J., Calder, P.C., Grimble, R.F., 2003. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 361, 477–485. doi:10.1016/S0140-6736(03)12468-3
- Timilsina, G.R., Shrestha, A., 2011. How much hope should we have for biofuels? *Energy*, 5th Dubrovnik Conference on Sustainable Development of Energy, Water & Environment Systems 36, 2055–2069. doi:10.1016/j.energy.2010.08.023
- Trad, Z., Akimbomi, J., Vial, C., Larroche, C., Taherzadeh, M.J., Fontaine, J.-P., 2015. Development of a submerged anaerobic membrane bioreactor for concurrent extraction of volatile fatty acids and biohydrogen production. *Bioresour. Technol.* 196, 290–300. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.095
- Tzschope, K., Augstein, A., Bauer, R., Kohlwein, S.D., Barth, G., 1999. trans-dominant mutations in the GPR1 gene cause high sensitivity to acetic acid and ethanol in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast Chichester Engl.* 15, 1645–1656. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199911)15:15<1645::AID-YEA491>3.0.CO;2-G
- Uçkun Kiran, E., Trzcinski, A., Webb, C., 2013. Microbial oil produced from biodiesel by-products could enhance overall production. *Bioresour. Technol.* 129, 650–654. doi:10.1016/j.biortech.2012.11.152
- Unagul, P., Assantachai, C., Phadungruengluij, S., Suphantharika, M., Tanticharoen, M., Verduyn, C., 2007. Coconut water as a medium additive for the production of docosahexaenoic acid (C22:6 n3) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02. *Bioresour. Technol.* 98, 281–287. doi:10.1016/j.biortech.2006.01.013
- Ursu, A.-V., Marcati, A., Sayd, T., Sante-Lhoutellier, V., Djelveh, G., Michaud, P., 2014. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 157, 134–139. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.071
- Uyar, B., Eroglu, I., Yücel, M., Gündüz, U., 2009. Photofermentative hydrogen production from volatile fatty acids present in dark fermentation effluents. *Int. J. Hydrog. Energy*, 2nd World Hydrogen Technologies Convention 2nd World Hydrogen Technologies Convention 34, 4517–4523. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.07.057
- Vajpeyi, S., Chandran, K., 2015. Microbial conversion of synthetic and food waste-derived volatile fatty acids to lipids. *Bioresour. Technol.*, International Conference on Emerging Trends in Biotechnology 188, 49–55. doi:10.1016/j.biortech.2015.01.099



- Venkata Subhash, G., Venkata Mohan, S., 2014a. Lipid accumulation for biodiesel production by oleaginous fungus *Aspergillus awamori*: Influence of critical factors. *Fuel* 116, 509–515. doi:10.1016/j.fuel.2013.08.035
- Venkata Subhash, G., Venkata Mohan, S., 2014b. Deoiled algal cake as feedstock for dark fermentative biohydrogen production: An integrated biorefinery approach. *Int. J. Hydrog. Energy* 39, 9573–9579. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.04.003
- Vertova, A., Aricci, G., Rondinini, S., Miglio, R., Carnelli, L., D'Olimpio, P., 2009. Electrodialytic recovery of light carboxylic acids from industrial aqueous wastes. *J. Appl. Electrochem.* 39, 2051–2059. doi:10.1007/s10800-009-9871-9
- Wallis, J.G., Watts, J.L., Browse, J., 2002. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem. Sci.* 27, 467.
- Wang, Y., Chen, K.S., Mishler, J., Cho, S.C., Adroher, X.C., 2011. A review of polymer electrolyte membrane fuel cells: Technology, applications, and needs on fundamental research. *Appl. Energy* 88, 981–1007. doi:10.1016/j.apenergy.2010.09.030
- Wang, Y., Gong, Z., Yang, X., Shen, H., Wang, Q., Wang, J., Zhao, Z.K., 2015. Microbial lipid production from pectin-derived carbohydrates by oleaginous yeasts. *Process Biochem.* 50, 1097–1102. doi:10.1016/j.procbio.2015.04.014
- Wang, Y.-P., Liu, X.-W., Li, W.-W., Li, F., Wang, Y.-K., Sheng, G.-P., Zeng, R.J., Yu, H.-Q., 2012. A microbial fuel cell–membrane bioreactor integrated system for cost-effective wastewater treatment. *Appl. Energy* 98, 230–235. doi:10.1016/j.apenergy.2012.03.029
- Wang, Z.-P., Xu, H.-M., Wang, G.-Y., Chi, Z., Chi, Z.-M., 2013. Disruption of the MIG1 gene enhances lipid biosynthesis in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 675–682. doi:10.1016/j.bbalip.2012.12.010
- Ward, O.P., Singh, A., 2005. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochem.* 40, 3627–3652. doi:10.1016/j.procbio.2005.02.020
- Wei, A., Zhang, X., Wei, D., Chen, G., Wu, Q., Yang, S.-T., 2009. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 1383–1389. doi:10.1007/s10295-009-0624-x
- Wen, J., Kerr, R.G., 2001. Purification and characterization of the fatty acid synthase from *Bugula neritina*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 128, 445–450.
- Whelan, J., 2008. The health implications of changing linoleic acid intakes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 79, 165–167. doi:10.1016/j.plefa.2008.09.013
- Wu, S., Hu, C., Jin, G., Zhao, X., Zhao, Z.K., 2010. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour. Technol.* 101, 6124–6129. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.111
- Wu, S.-T., Yu, S.-T., Lin, L.-P., 2005. Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. S31. *Process Biochem.* 40, 3103–3108. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.007
- Wu, S., Zhao, X., Shen, H., Wang, Q., Zhao, Z.K., 2011. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresour. Technol.* 102, 1803–1807. doi:10.1016/j.biortech.2010.09.033
- Wynn, J.P., bin Abdul Hamid, A., Ratledge, C., 1999. The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. *Microbiol. Read. Engl.* 145 ( Pt 8), 1911–1917. doi:10.1099/13500872-145-8-1911
- Wynn, J.P., Ratledge, C., 1997. Malic Enzyme is a Major Source of NADPH for Lipid Accumulation by *Aspergillus Nidulans*. *Microbiology* 143, 253–257. doi:10.1099/00221287-143-1-253
- Xing, D., Wang, H., Pan, A., Wang, J., Xue, D., 2012. Assimilation of corn fiber hydrolysates and lipid accumulation by *Mortierella isabellina*. *Biomass Bioenergy, Biorefinery* 39, 494–501. doi:10.1016/j.biombioe.2012.01.024

- Xue, F., Miao, J., Zhang, X., Luo, H., Tan, T., 2008. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresour. Technol.* 99, 5923–5927. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.046
- Xu, X., Kim, J.Y., Cho, H.U., Park, H.R., Park, J.M., 2015. Bioconversion of volatile fatty acids from macroalgae fermentation into microbial lipids by oleaginous yeast. *Chem. Eng. J.* 264, 735–743. doi:10.1016/j.cej.2014.12.011
- Xu, X., Kim, J.Y., Oh, Y.R., Park, J.M., 2014. Production of biodiesel from carbon sources of macroalgae, *Laminaria japonica*. *Bioresour. Technol.* 169, 455–461. doi:10.1016/j.biortech.2014.07.015
- Yahara, G.A., Javier, M.A., Tulio, M.J.M., Javier, G.R., Guadalupe, A.U.M., 2007. Modeling of yeast *Brettanomyces bruxellensis* growth at different acetic acid concentrations under aerobic and anaerobic conditions. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 30, 389–395. doi:10.1007/s00449-007-0135-y
- Yang, N., Hafez, H., Nakhla, G., 2015. Impact of volatile fatty acids on microbial electrolysis cell performance. *Bioresour. Technol.* 193, 449–455. doi:10.1016/j.biortech.2015.06.124
- Yang, S.T., White, S.A., Hsu, S.T., 1991. Extraction of carboxylic acids with tertiary and quaternary amines: effect of pH. *Ind. Eng. Chem. Res.* 30, 1335–1342. doi:10.1021/ie00054a040
- Yang, X., Jin, G., Gong, Z., Shen, H., Bai, F., Zhao, Z.K., 2014. Recycling biodiesel-derived glycerol by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 through the two-stage lipid production process. *Biochem. Eng. J.* 91, 86–91. doi:10.1016/j.bej.2014.07.015
- Ykema, A., Verbree, E.C., Kater, M.M., Smit, H., 1988. Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in wheypermeate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29, 211–218. doi:10.1007/BF01982904
- Ykema, A., Verbree, E.C., van Verseveld, H.W., Smit, H., 1986. Mathematical modelling of lipid production by oleaginous yeasts in continuous cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek* 52, 491–506.
- Yokochi, T., Usita, M.T., Kamisaka, Y., Nakahara, T., Suzuki, O., 1990. Increase in the  $\gamma$ -linolenic acid content by solvent winterization of fungal oil extracted from *Mortierella* genus. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67, 846–851. doi:10.1007/BF02540504
- Yoon, S.J., Choi, Y.-C., Son, Y.-I., Lee, S.-H., Lee, J.-G., 2010. Gasification of biodiesel by-product with air or oxygen to make syngas. *Bioresour. Technol.* 101, 1227–1232. doi:10.1016/j.biortech.2009.09.039
- Yuehan Lu, S.A.L., 2008. Comparison of three microquantity techniques for measuring total lipids in fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 65, 2233–2241. doi:10.1139/F08-135
- Yu, E.T., Zendejas, F.J., Lane, P.D., Gaucher, S., Simmons, B.A., Lane, T.W., 2009. Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum* (Baccilariophyceae) during starvation. *J. Appl. Phycol.* 21, 669–681. doi:10.1007/s10811-008-9400-y
- Yu, L.J., Qin, W.M., Lan, W.Z., Zhou, P.P., Zhu, M., 2003. Improved arachidonic acids production from the fungus *Mortierella alpina* by glutamate supplementation. *Bioresour. Technol.* 88, 265–268.
- Yu, X., Zheng, Y., Dorgan, K.M., Chen, S., 2011. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresour. Technol.* 102, 6134–6140. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.081
- Yu, X., Zheng, Y., Xiong, X., Chen, S., 2014. Co-utilization of glucose, xylose and cellobiose by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biomass Bioenergy* 71, 340–349. doi:10.1016/j.biombioe.2014.09.023
- Zacharof, M.-P., Lovitt, R.W., 2014. Recovery of volatile fatty acids (VFA) from complex waste effluents using membranes. *Water Sci. Technol.* 69, 495. doi:10.2166/wst.2013.717
- Zacharof, M.-P., Mandale, S.J., Williams, P.M., Lovitt, R.W., 2016. Nanofiltration of treated digested agricultural wastewater for recovery of carboxylic acids. *J. Clean. Prod.* 112, Part 5, 4749–4761. doi:10.1016/j.jclepro.2015.07.004

- Zeng, J., Zheng, Y., Yu, X., Yu, L., Gao, D., Chen, S., 2013. Lignocellulosic biomass as a carbohydrate source for lipid production by *Mortierella isabellina*. *Bioresour. Technol.* 128, 385–391. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.079
- Zhang, J., Fang, X., Zhu, X.-L., Li, Y., Xu, H.-P., Zhao, B.-F., Chen, L., Zhang, X.-D., 2011. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. *Biomass Bioenergy* 35, 1906–1911. doi:10.1016/j.biombioe.2011.01.024
- Zhang, S., Kim, T.-H., Lee, Y., Hwang, S.-J., 2012. Effects of VFAs Concentration on Bio-hydrogen Production with *Clostridium Bifermentans* 3AT-ma. *Energy Procedia*, 2011 2nd International Conference on Advances in Energy Engineering (ICAEE) 14, 518–523. doi:10.1016/j.egypro.2011.12.968
- Zhang, Y., Dubé, M.A., McLean, D.D., Kates, M., 2003. Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis. *Bioresour. Technol.* 90, 229–240.
- Zhan, J., Lin, H., Shen, Q., Zhou, Q., Zhao, Y., 2013. Potential utilization of waste sweetpotato vines hydrolysate as a new source for single cell oils production by *Trichosporon fermentans*. *Bioresour. Technol.* 135, 622–629. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.068
- Zheng, Y., Chi, Z., Ahring, B.K., Chen, S., 2012. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biofuel production: Ammonia's effect. *Biomass Bioenergy* 37, 114–121. doi:10.1016/j.biombioe.2011.12.022
- Zhong, Y., Ruan, Z., Zhong, Y., Archer, S., Liu, Y., Liao, W., 2015. A self-sustaining advanced lignocellulosic biofuel production by integration of anaerobic digestion and aerobic fungal fermentation. *Bioresour. Technol.* 179, 173–179. doi:10.1016/j.biortech.2014.12.013
- Zhou, A., Thomson, E., 2009. The development of biofuels in Asia. *Scopus*.
- Zhu, M., Yu, L.J., Liu, Z., Xu, H.B., 2004. Isolating *Mortierella alpina* strains of high yield of arachidonic acid. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 332–335. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01581.x
- Zhu, M., Zhou, P.P., Yu, L.J., 2002. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresour. Technol.* 84, 93–95.

## SITES INTERNET

- ASTM D 6751, norme américaine définissant les critères du biodiesel. Available at : <https://www.biofuelsystems.com/biodiesel/specification.htm>  
Dernière consultation le 13/01/16.
- British Petroleum Statistical Review of World Energy, 2015. Available at : <https://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/statistical-review-2015/bp-statistical-review-of-world-energy-2015-full-report.pdf>  
Dernière consultation le 02/01/16.
- Donnée Sigma-Aldrich, prix du glycérol. Available at : <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/g7893?lang=fr&region=FR>  
Dernière consultation le 02/01/16.
- Données statistiques AIE. Available at : <http://www.iea.org/statistics/>  
Dernière consultation le 02/01/16.
- EN14214, norme européenne définissant les critères du biodiesel. Available at : <https://www.biofuelsystems.com/biodiesel/specification.htm>  
Dernière consultation le 13/01/16.
- FAO : BIOFUELS: prospects, risks and opportunities, 2008. Available at : <http://www.fao.org/docrep/011/i0100e/i0100e00.htm>  
Dernière consultation le 02/01/16.
- FDA. *Generally Recognized as Safe (GRAS)*. Available at : <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>.  
Dernière consultation le 02/10/13.

Feuille de route AIE : Biofuels for transport roadmap. Available at :  
[https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/Biofuels\\_foldout.pdf](https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/Biofuels_foldout.pdf)  
 Dernière consultation le 02/01/16.

IFP, Panorama 2015 : Les émissions de gaz à effet de serre du secteur du transport routier : en route pour une inclusion dans le système européen des quotas de CO2? Available at :  
<http://www.ifpenergiesnouvelles.fr/Actualites/Actualite/Fil-d-actu/IPEN-fait-le-point-sur-les-emissions-de-gaz-a-effet-de-serre-du-secteur-du-transport-routier>  
 Dernière consultation le 02/01/16.

IFPEN – Voie de production des biocarburants de deuxième génération. Available at :  
<http://www.ifpenergiesnouvelles.fr/Espace-Decouverte/Tous-les-Zooms/Les-biocarburants-de-2e-generation-proches-de-l-industrialisation>  
 Dernière consultation le 02/01/16.

Rapport annuel 2014 AIE. Available at :  
[https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/2014\\_IEA\\_AnnualReport.pdf](https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/2014_IEA_AnnualReport.pdf)  
 Dernière consultation le 02/01/16.

Rapport annuel 2014 Opec. Available at : [http://www.opec.org/opec\\_web/en/publications/337.htm](http://www.opec.org/opec_web/en/publications/337.htm)  
 Dernière consultation le 02/01/16.

Rapport Ineris : Les biocarburants à partir de ressources lignocellulosiques : Présentation des filières et identification des risques, 2006. Available at :  
[http://www.ineris.fr/centredoc/rapport\\_2.pdf](http://www.ineris.fr/centredoc/rapport_2.pdf)  
 Dernière consultation le 02/01/16.

Total, composition Diesel Premier. Available at :  
<http://www4.total.fr/Europe/France/pdf/carburants/Fiche-Technique-TOTAL-DIESEL-PREMIER.pdf>  
 Dernière consultation le 13/01/16.

U.S. Energy Information Administration, 2013. Available at :  
<http://www.eia.gov/tools/faqs/faq.cfm?id=41&t=6>  
 Dernière consultation le 02/01/16.

## LISTE DES PUBLICATIONS

- Béligon, V.**, Christophe, G., Fontanille, P., Larroche, C., 2016. Microbial lipids as potential source to food supplements. *Curr. Opin. Food Sci.* 7, 35–42. doi:10.1016/j.cofs.2015.10.002
- Béligon, V.**, Poughon, L., Christophe, G., Lebert, A., Larroche, C., Fontanille, P., 2015. Improvement and modeling of culture parameters to enhance biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* grown on acetate. *Bioresour. Technol.* 192, 582–591. doi:10.1016/j.biortech.2015.06.041
- Béligon, V.**, Poughon, L., Christophe, G., Lebert, A., Larroche, C., Fontanille, P., n.d. Validation of a predictive model for fed-batch and continuous lipids production processes from acetic acid using the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biochem. Eng. J.* doi:10.1016/j.bej.2016.01.016
- Béligon, V.**, Molina, G., Christophe, G., Larroche, C., Lebert, A., Fontanille, P., In Press. Microbial Single-Cell Oils: Precursors of Biofuels and Dietary Supplements, in: Bicas, J.L., Maróstica, M.R.J., Pastore, G.M. (Eds.), *Biotechnological production of natural ingredients for food industry*. Bentham Sciences Publisher.
- Béligon, V.**, Noblecourt, A., Christophe, G., Lebert, A., Larroche, C., Fontanille, P. Proof of concept for biorefinery approach aiming at two bioenergy production compartments, hydrogen and biodiesel, coupled by an external membrane. *Biofuels*, accepté en mars 2016.

## LISTE DES COMMUNICATIONS

### COMMUNICATIONS ORALES

**Béligon, V.**, Christophe, G., Nouaille, R., Pessiot, J., Larroche, C., Lebert, A., Fontanille, P. 26-29 mars 2013. Valorisation d'acides gras volatils issus de procédés de dégradation anaérobie en lipides microbiens pour la production de biodiesel. GDR 2977 PROBBE. Roquebrune-sur-Argens, France.

**Béligon, V.**, Christophe, G., Larroche, C., Lebert, A., Fontanille, P. 11 février 2014. Bioconversion de lipides utilisables comme biodiesel à partir d'acides gras volatils. Rencontre Doctorants/Lycéens, Clermont-Ferrand, France.

**Béligon, V.**, Christophe, G., Larroche, C., Lebert, A., Fontanille, P. 15 avril 2014. Production par des levures oléagineuses de lipides microbiens utilisables comme biodiesel à partir de co-produits de fermentation. Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois, Aubière, France.

**Béligon, V.**, Trad, Z., Christophe, G., Vial, C., Larroche, C., Lebert, A., Fontanille, P. 7-10 septembre 2014. Valorization of volatile fatty acids to microbial lipids by oleaginous yeasts for biodiesel production. Congrès international ESBES-IFIBIOP. Lille, France.

**Béligon, V.**, Cruvellier, N. 9 octobre 2014. Bioénergies et recyclage : les super héros de demain. Fête de la Science. Aubière, France.

**Béligon, V.**, Christophe, G., Larroche, C., Lebert, A., Fontanille, P. 10-11 décembre 2014. Valorization of volatile fatty acids to microbial lipids by oleaginous yeasts for biodiesel production. Rencontres internationales ICAST. Aubière, France.

### COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

**Béligon, V.**, Christophe, G., Larroche, C., Lebert, A., Fontanille, P. 16-17 mai 2013. Valorisation d'acides gras volatils issus de procédés de dégradation anaérobie en lipides microbiens pour la production de biodiesel. Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE. Aubière, France.

**Béligon, V.**, Christophe, G., Larroche, C., Lebert, A., Fontanille, P. 2 octobre 2014. Bioconversion d'acides gras volatils en lipides microbiens par des levures oléagineuses. Journée scientifique CODEGEPR. Lyon, France.

Fontanille, P., **Béligon, V.**, Trad, Z., Christophe, G., Vial, C., Larroche, C. 7-10 septembre 2014. An example of biorefinery concept for feedstock degradation and bioenergy production. Congrès international ESBES-IFIBIOP. Lille, France.

Trad, Z., Akinbomi, J., **Béligon, V.**, Christophe, G., Fontanille, P., Larroche, C., Vial, C. 7-10 septembre 2014. Biohydrogen production using anaerobic membrane reactor. Congrès international ESBES-IFIBIOP. Lille, France.

## **Valorization of volatile fatty acids to microbial lipids by oleaginous yeasts for biodiesel production**

**Résumé :** Une part importante de la production mondiale de vecteurs énergétiques et de produits chimiques provient de la raffinerie de combustibles fossiles. En raison de l'augmentation du prix du pétrole et de son impact environnemental, la recherche de solutions alternatives, écologiques et économiques constitue l'un des enjeux de notre siècle. Le remplacement du pétrole par de la biomasse en tant que matière première pour la production de carburants et de produits chimiques constitue la force motrice dans le développement de complexes de bioraffinerie.

Cette étude fait partie d'un projet de bioraffinerie visant la valorisation de biomasse lignocellulosique par la production d'hydrogène et de lipides microbiens précurseurs de biodiesel. Ce travail se concentre en particulier sur l'étape de production de biomasse et de lipides par la levure oléagineuse *Cryptococcus curvatus* à partir d'acides gras volatils (AGVs) synthétisés au cours de la fermentation anaérobie productrice d'hydrogène. Les cultures ont dans un premier temps été réalisées à partir d'un substrat modèle, l'acétate, en fed-batch et en continu. La détermination de l'influence de différents paramètres opératoires sur la production de biomasse et de lipides à partir d'acétate a permis de mettre au point des cultures en fed-batch dont les cinétiques, les productivités et les rendements finaux étaient compétitifs avec ceux rapportés dans la littérature pour des cultures sur substrats simples. Un modèle de croissance et de production de lipides a été construit à partir de ces données afin de prédire le comportement de la souche lors de cultures continues, permettant d'obtenir des productivités en lipides et en biomasse élevées. Enfin, des cultures ont été menées à partir d'AGVs issus de surnageant de fermentation anaérobie. Les résultats ont confirmé la croissance de ces levures sur ce substrat particulier et la production de lipides dont la composition en acides gras estérifiés était compatible avec une utilisation comme biodiesel.

**Mots clés :** *bioconversion – acides gras volatils – Cryptococcus curvatus – lipides microbiens – biodiesel*

**Abstract:** A great part of the global production of energy vectors and chemicals comes from fossil fuels refinery. Because of the increase in oil price and their environmental impacts, the search for alternative, ecological and economic solutions is a current challenge. The replacement of oil with biomass as raw material for the production of fuels and chemicals is the driving force for the development of biorefinery complexes.

This study is part of a project aiming at the biorefinery of lignocellulosic biomass for hydrogen and microbial lipids as biodiesel precursors. This work focuses on the biomass and lipids production step by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* using volatile fatty acids (VFAs) as carbon sources, which are synthesized during the anaerobic fermentation step. Yeast cultures have initially been realized using a model substrate, acetate, and fed-batch and continuous modes. The determination of the influence of different operating parameters on the biomass and lipids production led to the development of fed-batch cultures which kinetics, productivities and yields were competitive with those reported in the literature for cultures on simple substrates. A growth and lipid production model was built from these data to predict the behavior of the strain during continuous cultures and to obtain high lipid and biomass productivities. Finally, cultures were conducted using VFAs from anaerobic fermentation supernatant. The results confirmed the growth of these yeasts on this particular substrate and the production of lipids which composition was compatible with use as biodiesel.

**Keywords:** *bioconversion – volatile fatty acids – Cryptococcus curvatus – microbial lipids - biodiesel*